

Untersuchungen zur Differenzierung der domestizierten und der Wildform von *Sus scrofa* in Lebensmitteln

vorgelegt von dem
staatlich geprüften Lebensmittelchemiker
Andreas Butschke

Von der Fakultät für Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

Genehmigte Dissertation

Prüfungsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. H. Kunzek
Berichter: Prof. Dr. Dipl. Ing. D. Knorr
Berichter: Priv. Dozent Dr. K.-W. Bögl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. Dezember 2003

Berlin 2004

D83

Abstract

In dieser Arbeit wurden zahlreiche DNA-analytische Untersuchungen wie PCR-RFLP, RAPD oder Sequenzierung an Haus- und Wildschweinen vorgenommen. Durch Vergleich von Mustern und Sequenzen wurde geprüft, ob es sich um individuelle Merkmale handelt oder um gruppenspezifische Marker, die für eine Differenzierung der domestizierten Form vom Wildschwein verwendet werden können. Untersucht wurden drei Gene, die in Zusammenhang mit dem äußeren Erscheinungsbild des Tieres gebracht werden – das Melanocortin-1-Rezeptor-Gen, das Tyrosinase-Gen und das Immunorezeptor DAP10-Gen. Weiterhin wurde ein Gen, zwei nicht-codierende Bereiche und Introns untersucht, die nicht mit äußeren Merkmalen in Verbindung stehen – das Cytochrom B-Gen, der D-Loop-Bereich und der repetitive Bereich des Mikrosatelliten S602 sowie Introns des Immunorezeptor DAP10-Gens. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei dem *cytB*-Gen, da hier bereits eine RFLP-Analytik für die Differenzierung von Haus- und Wildschweinen etabliert war, die es zu untersuchen galt.

Die DNA-Sequenzvergleiche zeigten bei den untersuchten Tieren der Art *Sus scrofa* eine große Homogenität im Vergleich zu den Unterschieden zwischen Tieren verschiedener Arten. Bei Sequenzabweichungen handelt es sich in der Regel um isolierte Punktmutationen, die von der Art her ausschließlich Substitutionen und keine Deletionen sind. Lediglich bei der repetitiven Sequenz ist eine unterschiedliche Anzahl an Repeats und einer daraus resultierenden unterschiedlichen Länge der DNA-Sequenz vorhanden, die jedoch nicht gruppenspezifisch ist. Eine Analytik zur Differenzierung der Formen beruht somit auf der Identifizierung von Punktmutationen.

Bei Untersuchung der publizierten Differenzierungsmethoden oder Sequenzheterologien von Haus- und Wildschweinen zeigte sich, dass die Muster und Sequenzen innerhalb einer Form nicht homogen sind. Es gab bei jedem Marker mehrere Individuen einer Form, deren DNA-Sequenz von der der anderen Tiere abwich. Auch bei den weiteren untersuchten Sequenzen konnten keine Mutationen gefunden werden, die bei allen Individuen einer Form identisch waren. Die Sequenzheterogenität unter allen Individuen ist größer als die zwischen der Wild- und der domestizierten Form. Für die Differenzierung der Formen ist somit die Anwendung mehrerer Marker notwendig.

Die genaueste Aussage über die Identität der Probe lässt sich aufgrund der Sequenzierung mehrerer DNA-Abschnitte vornehmen. Insgesamt konnten 14 Marker, die für die Unterscheidung der Formen geeignet sind, identifiziert werden. Einige wichtige Marker lassen sich über eine PCR-RFLP-Analyse identifizieren, für zwei Marker im D-Loop wurde ein Real-Time-PCR-System entwickelt.

Meinen Eltern aus Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1998 bis Mai 2001 am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin im Fachgebiet 213 (Zentrale Koordinationsstelle für neuartige Lebensmittel, Gentechnik) in Zusammenarbeit mit der Fakultät für Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

Die Arbeit wurde ermöglicht durch die kostenlose Bereitstellung von authentischen Proben von:

- Dr. Neumann vom Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Frankfurt/Oder
- Dr. Schwägele von der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach
- Chemisches Landesuntersuchungsamt Münster
- Dr. Busch vom Landesuntersuchungsamt Südbayern
- Tierzuchtforschung e.V. München - Institut für Blutgruppenforschung und Immunbiologie.

Inhalt

I EINLEITUNG	1
II PROBLEMSTELLUNG.....	4
III GRUNDLAGEN / STAND DER WISSENSCHAFT	6
1 Unterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen.....	6
1.1 Taxonomische und historische Betrachtung	6
1.2 Morphologische Betrachtung (Phänotyp)	10
1.3 Genetische Betrachtung (Genotyp)	12
2 Auswahl der Zielsequenzen	13
2.1 Analyse Protein-codierender DNA (Gene)	13
2.2 Analyse von nicht-codierenden DNA-Bereichen.....	21
2.3 Analyse des gesamten Genoms	23
3 Auswahl molekularbiologischer Methoden	25
3.1 DNA-analytische Methoden.....	25
3.2 Protein-analytische Methoden.....	30
3.3 Vergleich der Analysenmethoden	31
IV MATERIAL UND METHODEN.....	32
1 Material.....	32
1.1 Reagenzien.....	32
1.2 Primer und Sonden	37
1.3 Proben	39
1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	42
2 Methoden	43
2.1 DNA-Präparation.....	43
2.2 PCR.....	48
2.3 Gelelektrophorese.....	50
2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	51
2.5 Sequenzierung	52
2.6 Real-Time-PCR	56
V ERGEBNISSE	60
1 Extraktionsmethoden	60
1.1 Vergleich der Aufarbeitungsmethoden.....	60
1.2 Alternative Aufarbeitung für Blutproben.....	66
1.3 Primer zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA	67
2 Cytochrom b-Gen	67
2.1 PCR.....	67
2.2 RFLP	71
2.3 Sequenzierung	73
2.4 Ermittlung neuer Sequenzabschnitte zur Differenzierung anhand von Sequenzvergleichen auf dem <i>cytB</i> -Gen.....	79

VERZEICHNISSE
INHALT

3	Melanocortin-1-Rezeptor-Gen	91
3.1	Primerdesign	91
3.2	Sequenzierung	93
3.3	RFLP	97
4	D-Loop-Bereich.....	100
4.1	PCR.....	100
4.2	Sequenzierung	102
4.3	Restriktion.....	106
5	Tyrosinase-Gen.....	113
5.1	PCR.....	113
5.2	Sequenzierung	114
6	Immunorezeptor DAP10-Gen	119
6.1	PCR.....	119
6.2	Sequenzierung	121
7	Mikrosatellit S0602	125
7.1	PCR.....	125
7.2	Sequenzierung	126
8	Untersuchungen mit Real-Time-PCR-Systemen.....	129
8.1	Schmelzpunktbestimmung mit Sybr [®] Green I bei Cytb 1f/2r-Amplifikaten.....	130
8.2	Schmelzpunktbestimmung mit Sybr [®] Green I bei D-Loop-Amplifikaten.....	132
8.3	Primer für kleinere Amplifikate und Sonden	134
9	RAPD-PCR	146
VI DISKUSSION		150
1.1	Extraktion.....	150
1.2	Sequenzvergleiche.....	153
1.3	Sequenzierungen.....	155
1.4	RAPD-Analyse.....	163
1.5	Übersicht der Marker.....	164
1.6	Real-Time-PCR	165
1.7	Ausblick	165
LITERATUR		167
Lebenslauf		183

Abbildungen

Abbildung 1: Albrecht Dürer: Der verlorene Sohn bei den Schweinen, 1497-98 (Ausschnitt).....	7
Abbildung 2: Europäisches Wildschwein und Hausschwein der Rasse Piétrain im Vergleich.....	10
Abbildung 3: Links:Frischlinge von Wildschweinen. Rechts: Wollschweine.....	11
Abbildung 4: Mitochondriale DNA (mtDNA) des Schweins (Lin <i>et al.</i> , 1999 sowie Ursing und Arnason, 1998).....	14
Abbildung 5: Biosynthese verschiedener Melanine aus Tyrosin.	17
Abbildung 6: Prinzip der Kapillarelektrophorese beim 310 Genetic Analyzer ABI Prism™.....	55
Abbildung 7: Prinzip der Fluoreszenzmessung mit Hybridisierungssonden beim LightCycler™.....	57
Abbildung 8: PCR verschiedener Aufarbeitungen unterschiedlicher Proben – Teil a.	61
Abbildung 9: PCR verschiedener Aufarbeitungen unterschiedlicher Proben – Teil b.	62
Abbildung 10: PCR verschiedener Aufarbeitungen unterschiedlicher Proben – Teil c.	62
Abbildung 11: Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden bei verschiedenen Verarbeitungsstufen und Tierarten.	64
Abbildung 12: Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden beim Schweinefleisch.....	65
Abbildung 13: Amplifikation von aufgereinigten Blut - und Kontrollproben mit dem Primerpaar MC 1f/3r.	66
Abbildung 14: Amplifikation von aufgereinigten Blut-* und Kontrollproben mit den Primerpaaren DL1f/3r (2-15) und MC 1f/3r (16-23).	66
Abbildung 15: Anwendung verschiedener Eukaryonten-Primer bei unterschiedlichen Tierarten.....	67
Abbildung 16: Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur der Primer Cytb 1fSW/2- SW.	68
Abbildung 17: Verwendung verschiedener Primer in der PCR bei verschiedenen Tierarten.....	70
Abbildung 18: RFLP mit <i>Hinf</i> I des Amplifikats der Primer Cytb 1f/2r.....	71
Abbildung 19: Vergleich der DNA-Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen)- und Wildschweinen (untere Sequenzen) im ersten Teil des Cytb1f/2r- Amplifikates.....	73
Abbildung 20: Vergleich der DNA-Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen)- und Wildschweinen (untere Sequenzen) im zweiten Teil des Cytb1f/2r- Amplifikates.....	74
Abbildung 21: Vergleich der DNA-Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen)- und Wildschweinen (untere Sequenzen) im dritten Teil des Cytb1f/2r- Amplifikates.....	75
Abbildung 22: Elektropherogramm eines <i>cytB</i> -Bereichs von Haus- und Wildschweinen.....	79
Abbildung 23: Sequenzvergleich des <i>cytB</i> -Gens zwischen Tieren verschiedener Ordnungen.....	80
Abbildung 24: Sequenzvergleich des <i>cytB</i> -Gens zwischen verschiedenen Arten einer Gattung (<i>Hylobates</i>).	81
Abbildung 25: Sequenzvergleich des <i>cytB</i> -Gens zwischen Tieren verschiedener Unterarten von <i>Sus scrofa</i>	82
Abbildung 26: Lage und Größe der Amplifikate im <i>cytB</i> -Gen.	83
Abbildung 27: Sequenzvergleich des Cytb 2f/3r-Abschnitts zwischen Haus- und Wildschweinen.	84
Abbildung 28: Sequenzvergleich des Cytb 3f/4r-Abschnitts zwischen Haus- und Wildschweinen.	84

Abbildung 29: Sequenzvergleich des Cytb 4f/5r-Abschnitts zwischen Haus- und Wildschweinen.	86
Abbildung 30: Sequenz des <i>cytB</i> -Gens von Wild- und Hausschweinen mit den aufgetretenen Varianten.	90
Abbildung 31: Primer zur Amplifikation des <i>mc1r</i> -Gens.	91
Abbildung 32: Amplifikation des <i>mc1r</i> -Gens mit den MC-Primern bei verschiedenen Annealingtemperaturen (T _A).	91
Abbildung 33: Vergleich der Sequenzen von Hausschweinen (obere 11 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 9 Sequenzen) im Amplifikat der Primer MC 1f/ MC 3r.	93
Abbildung 34: Vergleich der Sequenzen von Haus- und Wildschweinen im Amplifikat der Primer MC 2f/MC 5r.	94
Abbildung 35: Vergleich der Sequenzen von Haus- und Wildschweinen im Amplifikat der Primer MC4f/ MC 6r.	95
Abbildung 36: Übertragung von 234 Basen des <i>mc</i> -Gens von Hausschwein Nr. 5 (oben) und Wildschwein Nr. 9(unten) in die korrespondierende Aminosäuresequenz.	96
Abbildung 37: Vergleich der schneidenden Restriktionsenzyme im Bereich des Amplifikats der Primer MC 1f/3r.	97
Abbildung 38: Gelelektrophorese der RFLP-Analytik von Haus- und Wildschweinen mit dem Primerpaar MC 1f/3r.	98
Abbildung 39: Gelelektrophorese der RFLP-Analytik von Haus- und Wildschweinen mit dem Primerpaar MC 1f/3r.	98
Abbildung 40: Sequenzvergleich des Amplifikats der Primer DL 1f/3r zwischen Hausschwein (pig1) und Rind (cattle).	100
Abbildung 41: Primer und Amplifikate im D-Loop-Bereich.	101
Abbildung 42: Vergleich der Sequenzen von Haus- (obere 9 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 5 Sequenzen) im ersten Teil des Amplifikats der Primer DL 1f/3r.	102
Abbildung 43: Vergleich der Sequenzen von Hausschweinen (obere 9 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 5 Sequenzen) im zweiten Teil des Amplifikats der Primer DL 1f/3r.	103
Abbildung 44: Vergleich der Sequenzen von Hausschweinen (obere 9 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 5 Sequenzen) im dritten Teil des Amplifikats der Primer DL 1f/3r.	104
Abbildung 45: Sequenzvergleich des Amplifikationsabschnitts DL 2f/5r zwischen Hausschweinen (obere Sequenzen) und Wildschweinen (untere Sequenzen).	104
Abbildung 46: Sequenzvergleich des Amplifikationsabschnitts DL 4f/6r zwischen Hausschweinen (oben) und Wildschwein (unten).	105
Abbildung 47: Schneidende Restriktionsenzyme in dem Teil des DL 1f/3r-Amplifikates, in dem die Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen auftreten.	107
Abbildung 48: Vergleich der Schnittstellen der Restriktionsenzyme <i>Tsp509I</i> und <i>BfaI</i> bei den DNA-Sequenzen einer Haus- und Wildschweinprobe im DL 1f/3r-Amplifikat.	108
Abbildung 49: RFLP des DL 1f/3r-Amplifikats mit den Enzymen <i>Tsp509I</i> (links) und <i>BfaI</i> (rechts).	109
Abbildung 50: RFLP-Analytik des DL 1f/3r-Amplifikats mit dem Restriktionsenzym <i>Tsp509I</i>	109
Abbildung 51: Lage der Primer im <i>tyr</i> -Gen.	113
Abbildung 52: Optimierung der PCR-Bedingungen für die Amplifikation des <i>tyr</i> -Gens.	113
Abbildung 53: Sequenzvergleich Teil a zwischen Haus- und Wildschweinen im <i>tyr</i> -Gen.	115

Abbildung 54: Sequenzvergleich Teil b zwischen Haus- und Wildschweinen im <i>tyr</i> -Gen....	116
Abbildung 55: Translation der DNA-Sequenz des <i>tyr</i> -Gens von Probe 6 in die Aminosäuresequenz.....	117
Abbildung 56: Lage der Primer und Amplifikate im <i>dap10</i> -Gen.	119
Abbildung 57: DNA-Sequenz des Amplifikats der Primer Imu 1f/3r.....	121
Abbildung 58: DNA-Sequenz des Amplifikats der Primer Imu 1f/3r.....	122
Abbildung 59: DNA-Sequenz des Amplifikats der Primer Imu 2f/5r.....	123
Abbildung 60: Lage der Primer und des entstehenden Amplifikats im Mikrosatelliten.	125
Abbildung 61: Sequenzvergleich zwischen Haus- und Wildschweinfleisch im Bereich des Mikrosatelliten S0602, Teil a.....	126
Abbildung 62: Sequenzvergleich zwischen Haus- und Wildschweinfleisch im Bereich des Mikrosatelliten S0602, Teil b.....	127
Abbildung 63: Beobachtung der Fluoreszenzzunahme während der PCR im LightCycler™.....	129
Abbildung 64: Schmelzkurven der Cytb 1f/2r-Amplifikate der Hausschweine 1 und 5 mit verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen.	131
Abbildung 65: Schmelzpunktanalyse der Cytb 1f/2r-Amplifikate mit 4 mmol/l Magnesiumchlorid.....	131
Abbildung 66: Schmelzkurven der D-Loop-Amplifikate von Haus- und Wildschweinproben mit den Primerpaaren a) DL1f/3r b) DL2f/5r c) DL4f/6r.	133
Abbildung 67: Lage der Primer für die verkürzten Amplifikate im D-Loop.....	134
Abbildung 68: Amplifikation ausgewählter Proben mit den kurzen D-Loop-Primern.	135
Abbildung 69: Schnittstellen der Restriktionsenzyme in den Amplifikaten der Primer D- sus f1 und D-Sus r2.	136
Abbildung 70: RFLP mit <i>Bfa</i> I von Hausschwein und Wildschweinen.	137
Abbildung 71: RFLP mit <i>Tsp</i> 509I von Haus- und Wildschweinen.....	137
Abbildung 72: Primer und Sonde für die Real-Time-PCR.	139
Abbildung 73: Lage der Sonde und der Mutationen im L-Strang des Amplifikationsbereichs.....	139
Abbildung 74: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der TT- Sonde.	142
Abbildung 75: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der TC- Sonde	142
Abbildung 76: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der CC- Sonde.	143
Abbildung 77: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der CT- Sonde.	143
Abbildung 78: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der TC- long-Sonde.	144
Abbildung 79: RAPD-PCR von Haus- und Wildschwein-DNA mit einer Primermischung aus Ra1, Ra2, Ra3 und Ra4.	146
Abbildung 80: RAPD-PCR mit verschiedenen Primer-Kombinationen.	148
Abbildung 81: Herkunft der Proben aus Brandenburg und ihr <i>Hinf</i> I-Schnittverhalten:	156

Tabellen

Tabelle 1:	Taxonomische Einordnung des Wildschweins.....	6
Tabelle 2:	Rassenverteilung in Herdbuch- und Vermehrungsbetrieben in Deutschland im Jahr 1994.	9
Tabelle 3:	Mitochondrialer Code	15
Tabelle 4:	Vergleich der Methoden im Hinblick auf die Eignung zur Tierartenidentifizierung.	31
Tabelle 5:	Chemikalien.....	32
Tabelle 6:	Enzyme.....	33
Tabelle 7:	Fertigreagenzien.	33
Tabelle 8:	Reagenzien-Rezepturen.	34
Tabelle 9:	Primer, die der Literatur entnommen wurden.	37
Tabelle 10:	Primer, die während dieser Arbeit entwickelt wurden.	37
Tabelle 11:	DNA-Sonden, die für die Real-Time-PCR entwickelt wurden.	38
Tabelle 12:	Referenz- und Matrixproben von Haus- und Wildschweinen sowie von anderen Tierarten.	39
Tabelle 13:	Geräte.....	42
Tabelle 14:	Verbrauchsmaterial.....	42
Tabelle 15:	Salzkonzentration zur DNA-Fällung.	46
Tabelle 16:	Berechnung des Restriktionsansatzes mit einem Volumen von je 25 µl.....	52
Tabelle 17:	Zusammensetzung des Sequenzierungs-Ansatzes mit einem Volumen von 20 µl.	54
Tabelle 18:	Temperaturprogramm der Sequenzierungs-Reaktionen.	54
Tabelle 19:	Parameter für die Kapillarelektrophorese zur Sequenzierung.....	55
Tabelle 20:	Ansatz des Mastermix mit Sybr® Green I bei einem Ansatzvolumen von 20 µl.	57
Tabelle 21:	Ansatz des Mastermix für die Real-Time-PCR mit Hybridisierungssonden.	58
Tabelle 22:	Angewandte Extraktionsmethoden und Messung der extrahierten DNA.....	63
Tabelle 23:	Übersicht der <i>HinfI</i> -Schnitte bei Wildschweinproben (S= sequenziert).	72
Tabelle 24:	Auswertung der RFLP-Analytik des Cytb 1f/3r-Amplifikats mit dem Restriktionsenzym <i>HinfI</i>	73
Tabelle 25:	Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen im Abschnitt des Cytb 1f/2r-Amplifikats.	77
Tabelle 26:	Übersicht der Sequenzabweichungen im Cytb 1f/2r-Abschnitt.....	78
Tabelle 27:	Sequenzabweichungen von Hausschwein Probe Nr. 5 gegenüber den anderen sequenzierten Haus- und Wildschweinen.	78
Tabelle 28:	Auswirkungen der DNA-Sequenzunterschiede auf die Triplet-codierte Aminosäure-Sequenz.	87
Tabelle 29:	Zuordnung verschiedener Proben zu den vorkommenden Sequenzvarianten.....	87
Tabelle 30:	Mastermix für die PCR mit MC-Primern.	92
Tabelle 31:	PCR-Programm für PCR mit MC-Primern.	92
Tabelle 32:	Sequenzunterschiede im Bereich von 89-729 Basen des <i>mc1r</i> -Gens.....	96
Tabelle 33:	Restriktionsenzyme für die RFLP-Analytik an Position 242 des <i>mc1r</i> - Gens.	97
Tabelle 34:	Restriktionsfragmente des <i>BspHI</i> -Verdau von MC 1f/3r-Amplifikaten verschiedener Tierarten.....	99
Tabelle 35:	Auswertung der RFLP-Analytik von den MC 1f/3r-Amplifikaten mit <i>BspHI</i>	99
Tabelle 36:	Mastermix für die PCR mit DL-Primern.	101
Tabelle 37:	PCR-Temperaturprogramm für PCR mit DL-Primern.	101
Tabelle 38:	Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen im D-Loop.	106

Tabelle 39:	Restriktionsenzyme für die RFLP-Analytik im DL 1f/3r-Bereich.	107
Tabelle 40:	Theoretisch entstehende Restriktionsfragmente bei dem Verdau des DL 1f/3r-Amplifikats mit <i>Tsp509I</i> bzw. <i>BfaI</i>	108
Tabelle 41:	Vergleich der RFLP-Ergebnisse im DL 1f/3r- und im MC 1f/3r- Amplifikat.	110
Tabelle 42:	Auswertung der RFLP-Analytik mit <i>Tsp509I</i>	112
Tabelle 43:	Auswertung der RFLP-Analytik mit <i>BfaI</i>	112
Tabelle 44:	Ansatz für die PCR mit Tyr-Primern pro Ansatz á 25 µl.	114
Tabelle 45:	Temperaturprogramm für die PCR mit Tyr-Primern.	114
Tabelle 46:	Sequenzvarianten im <i>tyr</i> -Gen und deren Auswirkung auf die Aminosäure- Sequenz.	118
Tabelle 47:	Ansatz für die PCR mit Imu-Primern pro Ansatz á 25 µl.	120
Tabelle 48:	Temperaturprogramm-Zeit-Programm für die PCR mit Imu-Primern.	120
Tabelle 49:	Temperaturprogramm für die Amplifikation des S0602-Bereichs.	125
Tabelle 50:	Mastermix für die PCR im Mikrosatelliten S0602.	126
Tabelle 51:	Repetitive Sequenz im Mikrosatelliten S0602.	128
Tabelle 52:	Sequenzunterschiede im Mikrosatelliten S0602.	128
Tabelle 53:	Reaktionsansatz für eine Real-Time-PCR mit Sybr [®] Green I auf dem LightCycler [™]	130
Tabelle 54:	Temperaturprogramm für die PCR mit den Primern Cytb 1f/2r im LightCycler [™]	130
Tabelle 55:	Temperaturprogramm für die PCR im D-Loop-Bereich mit dem LightCycler [™]	132
Tabelle 56:	In der RFLP mit den Enzymen <i>BfaI</i> und <i>Tsp509I</i> entstandene Fragmente aus dem 137 Bp großen Amplifikat der PCR mit den Primern D-Sus f1/r2.	138
Tabelle 57:	Zusammenhang zwischen Restriktionsverhalten und Genotyp.	138
Tabelle 58:	Oligonukleotide für die Real-Time-PCR.	140
Tabelle 59:	Erwartete Temperaturdifferenzen zwischen den Schmelzpunkten der Sonden.	140
Tabelle 60:	Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR im LightCycler [™] mit Hybridisierungssonden.	141
Tabelle 61:	Temperaturprogramm für die PCR mit den Primern D-sus f1/r2 im LightCycler [™]	141
Tabelle 62:	Schmelztemperaturen der Sonden bei verschiedenen Proben.	144
Tabelle 63:	Abweichungen der Extremwerte vom nächsten Wert.	145
Tabelle 64:	Mastermix für die RAPD-PCR.	147
Tabelle 65:	Temperaturprogramm für die RAPD-PCR.	147
Tabelle 66:	Übersicht über die Marker zur Differenzierung von Haus- und Wildschweinen.	164

Abkürzungsverzeichnis

a	antisense-Strang der dsDNA mit komplementärer Sequenz zum Start- und Stopp-Codon des offenen Leserahmens
A	Adenin (Base)
ACTH	Adrenocorticotrope Hormon
a-ASP	Agouti Signal Proteins
a-MSH	a-Melanocyten-stimulierendes Hormon
AFLP	Amplified-fragment length polymorphism (deutsch: Amplifikations-Fragmentlängenmuster)
AS	Aminosäure
<i>Bfa</i> I	Restriktionsenzym aus <i>Bacteroides fragilis</i>
Bp	Basenpaare, Anzahl der Basen (A,T,G,C) eines DNA-Fragments
Bsp.	Beispiel
<i>Bsp</i> HI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus species</i> Stamm H
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Base)
cDNA	copy DNA oder complementary DNA, DNA die durch Reverse Transkription von mRNA transkribiert wurde
Cons.	Consensus-Sequenz
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CytB	Cytochrom B
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dest.	destilliert
DE	Deutsches Edelschwein, Hausschweinrasse
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
D-Loop	Displacement-Loop
DL	Deutsche Landrasse, Hausschweinrasse; in Verbindung mit Zahlen handelt es sich um Primer zur Amplifikation des D-Loop-Bereichs
DNA	Desoxyribonucleicacid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	double strand DNA (deutsch: Doppelstrang-DNA)
Du	Duroc, Hausschweinrasse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (deutsch: Ethylendiamintetraessigsäure)
f	forward (Primer)
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer, Sonden-Fluoreszenz-Technologie, die in der Real-Time-PCR, besonders beim LightCycler™, zum Einsatz kommt.
G	Guanin (Base)
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Kopplung eines Massenspektrometers an einen Gaschromatographen
GH	Growth Hormon (deutsch: Wachstumshormon)
h	Stunde
H-Strang	Heavy-Strang, Guanin-reicher Strang (+) der mtDNA
Ha	Hampshire, Hausschweinrasse
<i>Hinf</i> I	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenzae</i> Stamm f
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Hausschwein
I	Inosin (DNA-Base)
i.D.	innerer Durchmesser
ID	Identität einer Probe wie Art, Rasse, Form
Imu	Immunorezeptor
Konz.	Konzentration
L-Strang	Light-Strang, Cytosin-reicher Strang (-) der mtDNA
Lc	Leicoma, Hausschweinrasse
LE	low electroendosmosis, Produktbeschreibung von Agarose
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
<i>Mae</i> I	Restriktionsenzym aus <i>Methanococcus aeolicus</i>
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted-Laser-Desorptions-Ionisations-Time-of-Flight-Mass-Spectrometrie
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor

VERZEICHNISSE

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MGB	minor groove binder, Sonde für die Real-Time-PCR
mRNA	Messenger RNA, Transkriptionsprodukt der genomischen DNA
MS	molecular screening agarose, Produktbeschreibung von Agarose
MS602	DNA-Abschnitt mit repetitiven Elementen
mtDNA	Mitochondriale DNA
<i>MvnI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Methanococcus vannielii</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N	Platzhalter für beliebige DNA-Base
NIR	Near Infrared (deutsch: nahes Infrarot; in Bezug auf das sichtbare Spektrum)
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase chain reaction (deutsch: Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglykol
Phe	Aminosäure Phenylalanin
Pi	Pietrain, Hausschweinrasse
PIC	Mischung bestehend aus Phenol, Isoamylalkohol und Chloroform
Pro	Aminosäure Prolin
POMC	Proopiomelanocortin-Protein
R	Erweiterter IUB-Code für Nukleotide: A und G
r	revers (Primer)
Ra	Random (Primer)
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA (deutsch: zufällige DNA-Amplifikationsmuster)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (deutsch: Restriktionsfragmentlängenmuster)
RNA	Ribonucleicacid (deutsch: RNS = Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
Ryr1	Ryanodin-Rezeptor 1
s	Sekunde; sonst sense-Strang der dsDNA auf dem der Start- und Stopp-Codon lesbar ist
SDS	Sodiumdodecylsulfate (deutsch: Natriumdodecylsulfat)
SINE	Short interspersed element
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssDNA	single strand DNA (deutsch: Einzelstrang-DNS)
SSCP	single strand conformation polymorphism (deutsch: Einzelstrang-Konformationsmuster)
SSp.	Subspezies = Unterart
T	Thymin (Base) oder Temperatur (°C)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Puffer bestehend aus Tris und EDTA
T _m	Melting temperature (deutsch: Schmelztemperatur von doppelsträngiger DNA)
T _A	Annealing temperature (deutsch: Anlagerungstemperatur von Primern an die Ziel-DNA bei der PCR)
TBE	Puffer bestehend aus Tris, Borsäure und EDTA
TE	Puffer bestehend aus Tris, HCl und EDTA
TEN	Puffer bestehend aus Tris, NaCl und EDTA
TNE	Puffer bestehend aus Tris, NaCl und EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
<i>Tsp509I</i>	Restriktionsenzym aus einer <i>Thermus species</i> Stamm 509
Tyr	Tyranosinase
U	Uracil (Base); in Verbindung mit einer Zahl: Unit (deutsch: Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vergl.	Vergleich
Vol.	Volumen
WS	Wildschwein
Y	Erweiterter IUB-Code für Nukleotide: C und T

I EINLEITUNG

Die Auslobung eines Lebensmittels im Einzelhandel oder in Restaurants als Wild ist eine Qualitätsbezeichnung, die gegenüber vergleichbaren Produkten in der Regel mit einem höheren Preis zu bezahlen ist. Aufgrund der damit gegebenen wirtschaftlichen Vorteile erscheint die falsche Deklaration von Hausschwein-Produkten als Wildschwein attraktiv und nicht unwahrscheinlich. Bei den Landesuntersuchungsämtern in Deutschland treffen immer wieder Proben ein, die als Wild gekennzeichnet wurden und von den Verbrauchern beanstandet wurden. Während die Unterscheidung zwischen Schweinefleisch vom Zuchttier und vom Wild in rohem Zustand histologisch leicht möglich ist, ist eine Differenzierung bei prozessierten Produkten bisher nicht möglich. Bei Auslobung eines Lebensmittels mit einem Tatbestand, der nicht erfüllt wird, handelt es sich um Täuschung des Verbrauchers gemäß § 17 Abs. 1 Nr. 5b des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG, Zipfel 1999). Eine Täuschung liegt bei der Substitution einer wertbestimmenden höherwertigen Komponente durch eine minderwertige vor. Aufgetretene Fälle bei Fleisch sind z.B. die Verwendung von Känguru oder Pferdefleisch anstatt von Rindfleisch oder die Verwendung von Schweinefleisch für Huhn oder Kalbfleisch (Toorop *et al.*, 1997). Bei Wild-Produkten ist Fleisch von Wildtierarten eine wertbestimmende Komponente. Eine Täuschung liegt demnach bei Lebensmitteln mit der Auszeichnung „Wild“ wie „Wild-Gulasch“, „Wild-Pastete“ oder „Wildbret-Suppe“ vor, wenn in diesen Produkten kein Wild verwendet worden ist.

Wildschweine sind nach dem Rehwild mit 10.300 t Wildbretaufkommen im Jahr das in Deutschland am häufigsten verarbeitete Wild (ZMP-Bericht, 1999). Das langjährige Mittel der in Deutschland erlegten Wildschweine liegt bei 250.000 Stück, wobei im Jagdjahr 1996/1997 wegen der Schweinepest sogar 362.000 Tiere zur Strecke gebracht wurden. Im Vergleich dazu wurden in Deutschland im Jahr 2000 40,5 Millionen Hausschweine geschlachtet, das sind 30 % der EG-Produktion (aid, 1997). Während der durchschnittliche Preis für Hausschweine 1999 bei 1,05 € und 2000 bei 1,35 € je Kilogramm Schlachtgewicht liegt, hat man für Wildschweinfleisch ca. 25 % mehr zu bezahlen.

Zunehmende Attraktivität erhält das Wildfleisch neben Bioprodukten aufgrund der Haltungsbedingungen der in Europa üblichen Intensivmast. Die intensive Viehzucht führt aufgrund der auf maximale Fleischproduktion gezüchteten Rassen und der Haltung in engen Ställen zu verstärkter Anfälligkeit gegenüber Krankheiten. Dadurch sehen sich die Bauern dazu veranlasst, den Tieren Medikamente, u.a. auch Antibiotika, zuzuführen. Zur Förderung des Wachstums werden auch Hormone verabreicht. Bei Tieren in der freien Wildbahn ist dies

nicht möglich. Der Gedanke, Wild zu zähmen und kontrolliert fortzupflanzen, führte zu domestizierten Formen der Tiere. Ohne den Eingriff bei der gezielten Nachzucht zum Erhalt gewünschter Eigenschaften und bei artgerechter Haltung können die Tiere auch in einer vom Menschen kontrollierten Herde gegenüber der Wildform unverändert bleiben, wie das Beispiel der Rentiere zeigt. Diese wurden von den Samen im 17. Jahrhundert gezähmt und leben halbzahm in Herden von 300 bis 1000 Tieren. Auch in Deutschland wird Schwarz- und Rotwild in weitläufigen Gehegen, z.B. in Zoos oder auch zur Fleischverwertung gehalten. Solange eine Verarmung des Genpools z.B. durch Einbringen von Tieren aus anderen Populationen vermieden wird und eine Einkreuzungen z.B. von domestizierten Tieren unterlassen wird, sind diese den freilebenden Tieren gleichzustellen.

Bei der Tierart Schwein (*Sus scrofa*) existiert im Vergleich zu anderen Tierarten eine Besonderheit. Für die Ernährung des Menschen spielt sowohl die Wildform des Schweins wie auch die domestizierte Form eine wesentliche Rolle. Andere für Ernährung relevante Wildarten in Europa wurden nicht domestiziert oder die Wildarten sind nach der Domestizierung ausgestorben beziehungsweise für die Ernährung unwesentlich geworden. Nur bei der Tierart *Sus scrofa*, die für die Ernährung weiter Teile der Bevölkerung ein wichtiges Nutztier darstellt, existiert neben einer domestizierten Form eine bedeutende Wildform. Diese beiden Formen sind aus lebensmittelrechtlichen Aspekten unterschiedlich zu bewerten, obwohl es sich um die gleiche Tierart handelt. Lebensmittelrechtlich wird zwar zwischen Wild- und domestizierter Form aber nicht zwischen verschiedenen Rassen der domestizierten Form unterschieden. Die analytische Herausforderung ist nun, der Lebensmittelüberwachung eine Methode zur Verfügung zu stellen, die es ermöglicht, eine Unterscheidung von *Sus scrofa* f. domestica (Hausschwein) und *Sus scrofa scrofa* (Wildschwein) vorzunehmen, ungeachtet der jeweiligen Hausschweinrassen oder Wildschwein Populationen bzw. Unterarten. Methoden zur Differenzierung anderer Tierarten müssen lediglich eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Arten vornehmen, die molekularbiologisch größere Unterschiede aufweisen (Andersson, 1997).

Auch im Rahmen der Bekämpfung und Vorsorge der Schweinepest ist eine Differenzierung von Haus- und Wildschweinen zur Überprüfung der Probenidentität hilfreich.

Neben der Lebensmittelüberwachung gibt es noch ein anderes Gebiet, in dem die Unterscheidung von Haus- und Wildschweinen von Interesse ist. Verkehrsunfälle mit Wild verursachen jedes Jahr rund 3000 Personenschäden und Sachschäden, deren Kosten Millionen DM betragen (ADAC, 2000). Die Kosten werden von der Versicherung nur gezahlt, wenn Zeugen den Unfall gesehen haben oder Blutspuren bzw. Teile des Tieres den Tathergang bestätigen. Zum Zwecke des Versicherungsbetrugs kommt es vor, dass das Fahrzeug mit Blut

von Hausschweinen präpariert wird. Über konventionelle Blutuntersuchungen bzw. Bestimmung von Blutgruppen (Kurosawa *et al.*, 1984 sowie Oishi *et al.*, 1993) oder die Variationen des Erythrozyten Esterase-D Protein-Komplexes (Tanaka *et al.*, 1980) ist es ebenfalls nicht möglich, Hausschweine von Wildschweinen zu unterscheiden.

II PROBLEMSTELLUNG

Ziel der Arbeit ist die Entwicklung einer DNA-analytischen Methode zur Differenzierung von Haus- und Wildschweinen. Die DNA-Analytik, insbesondere unter Verwendung der PCR-Technologie, stellt die zurzeit sensitivste Methode zur Tierartendifferenzierung dar (Lockley und Bardsley, 2000). Zudem handelt es sich bei der DNA-Analytik um eine hoch spezifische Methode, da die DNA-Sequenz ein unverwechselbares Charakteristikum darstellt (Taberlet *et al.*, 1996). Die entwickelte Methode soll so robust sein, dass sie nicht nur in rohem Fleisch, sondern auch in verarbeiteten Produkten mit handelsüblichem Prozessierungsgrad erfolgreich angewendet werden kann. Ebenso wie Proteine wird auch die genomische DNA bei der Herstellung von Lebensmitteln und deren Lagerung zerstört. Die stärksten Einflüsse haben dabei die Temperatur, Scheerkräfte sowie der pH-Wert (Ashurst und Dennis, 1998). Die DNA wird unter diesen Einflüssen in kleine Bruchstücke degradiert, die aber auch bei stark prozessierten Lebensmitteln wie Vollkonserven mit ca. 100-300 Basenpaaren (Behrens *et al.*, 1999; Buntjer *et al.*, 1999; Candrian, 1994; Straub *et al.*, 1999) noch lang genug sind, um ihre Sequenz zu identifizieren bzw. sie in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu vervielfältigen. Bei geeigneter Wahl der Vervielfältigungssequenz ist es dann möglich, Aussagen über die Identität der verwendeten Tierart in diesem Lebensmittel zu treffen (Van der Velten und Schulze, 1997). Gegenüber Protein-basierten Methoden weist die PCR-Analytik auch eine höhere Sensitivität auf, so dass bereits Spuren einer Tier- oder Pflanzenart in einem Lebensmittel identifiziert werden können (Meyer R. *et al.*, 1996). Bei erhitzten Erzeugnissen versagt eine Analyse über Protein-analytische Methoden, wenn die Proteine denaturiert und gespalten wurden. Für die Differenzierung von nahe verwandten Taxa oder hoch erhitzten Produkten sowie stark verarbeiteten Mischungen existieren bislang keine zufriedenstellenden Protein-analytischen, serologischen oder histologischen Methoden (Meyer R. *et al.*, 1993; Beneke und Hagen, 1998). Für die Differenzierung von *Sus scrofa scrofa* und *Sus scrofa* f. *domestica* wurde auch für Rohprodukte bisher noch keine Methode veröffentlicht, die nicht auf der DNA-Analyse basiert.

Methoden zur DNA-analytischen Differenzierung von Tier- und Pflanzenarten sind bereits mehrfach entwickelt worden (Schreiber und Bögl, 1997), von denen einige in nationalen Ringversuchen getestet wurden (Laube *et al.*, 2001). Bisher gibt es in Deutschland nur eine DNA-analytische Methode zur Differenzierung von Tier- und Pflanzenarten in der Methodensammlung gemäß § 35 LMBG (BgVV, 1997), nämlich der Nachweis von *Glycine max* (Soja) in Wurst. Auch DNA-analytische Unterschiede zwischen *Sus scrofa scrofa* und *Sus scrofa* f. *domestica* sind in der Literatur beschrieben worden (siehe Kapitel III-2.1.1).

Unreproduzierbare Ergebnisse ließen jedoch Zweifel an der Zuverlässigkeit dieser Methoden aufkommen. Aufgrund des Mangels an Alternativmethoden werden diese aber nach wie vor verwendet. In dieser Arbeit wurde die Zuverlässigkeit der Methoden und die Ursachen für uneinheitliche Ergebnisse untersucht. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen Haus- und Wildschweinen ist nur mit geringen Unterschieden in der DNA-Sequenz zu rechnen. Daher ist es notwendig, zahlreiche Tiere aus verschiedenen Populationen zu untersuchen. Deshalb wurden die publizierten Methoden oder Sequenzunterschiede an 130 Wild- und Hausschweinproben aus verschiedenen Gebieten Deutschlands mit Hilfe der PCR und einem Restriktionsverdau überprüft und teilweise sequenziert.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Auswahl alternativer DNA-Bereiche, die für eine Differenzierung unterhalb der Artengrenze geeignet erscheinen. Dies können zum einen Gene sein, die für die sichtbaren morphologischen Unterschiede von Haus- und Wildschweinen verantwortlich sind, zum anderen aber auch DNA-Bereiche, die eine hohe Sequenzvariabilität aufweisen. Solche wenig konservierten Bereiche der DNA findet man besonders in nicht Protein-codierenden Sequenzabschnitten, wie z.B. Introns, Spacer-Regionen oder Sequenzabschnitten mit Steuerungsfunktionen. Durch Sequenzierung dieser Bereiche sollte gezeigt werden, in welchem Umfang DNA-Sequenzunterschiede zwischen den Formen bestehen und ob diese innerhalb einer Form homogen sind. Es sollte geprüft werden, ob diese Unterschiede für die Entwicklung einer Methode zur Differenzierung von Haus- und Wildschweinfleisch geeignet sind.

Neben der bei der lebensmittelchemischen Überwachung konkreten Problematik der Differenzierung von Haus- und Wildschwein zeigt diese Arbeit auch Möglichkeiten und Probleme der grundsätzlichen Fragestellung einer Differenzierbarkeit von wild- und domestizierten Formen auf.

III GRUNDLAGEN / STAND DER WISSENSCHAFT

1 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN HAUS- UND WILDSCHWEINEN

1.1 Taxonomische und historische Betrachtung

Die taxonomische Einordnung der durch Carl von Linné 1775 benannten Art *Sus scrofa* ist entsprechend der NCBI Taxonomie-Datenbank (Wheeler *et al.*, 2000) wie in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Taxonomische Einordnung des Wildschweins

Reich:	Eukaryota
Unterreich:	Metazoa (Vielzeller)
Abteilung:	Eumetazoa (Echte Vielzeller)
Unterabteilung:	Bilateria
	Coelomata (Abgrenzung zu Coelenterata)
Stammreihe:	Deuterostomia
Stamm:	Chordata (Rückenmarktiere)
Unterstamm:	Vertebrata, Craniota (Wirbeltiere)
Überklasse:	Gnathostomata (Kiefermäuler)
	Teleostomi
	Euteleostomi
	Sarcopterygii
	Tetrapoda
	Amniota
Klasse:	Mammalia (Säugetiere)
	Theria (Abgrenzung zu Prototheria)
Unterklasse:	Eutheria (Placentatiere)
Überordnung:	Cetartiodactyla
Ordnung:	Artiodactyla (Paarzeher)
Unterordnung:	Suina
Überfamilie:	Suidea (Schweineartige)
Familie:	Suidae (Altweltliche Schweine)
Gattung:	<i>Sus</i>
Art:	<i>Sus scrofa</i>
Unterart:	<i>Sus scrofa scrofa</i> (Wildschwein)

Innerhalb der Unterordnung Suina gibt es neben den Haus- und Wildschweinen keine für die Ernährung des Menschen bedeutenden Arten. Bei der Differenzierung von Schweine-Taxa handelt es sich demnach immer um eine Differenzierung von Rassen oder von domestizierten und Wild-Formen, d.h. von Taxa unterhalb der Artengrenze. Bei der Differenzierung von Schweinen zu anderen im Lebensmittelbereich relevanten Tierarten handelt es sich mindestens um die Unterscheidung von Tieren, die taxonomisch unterschiedlichen Unterordnungen zugerechnet werden, wie Ruminantia (z.B. Rind, Reh, Giraffe, Springbock), Tylopoda (z.B. Kamel), Cetacea (Wale) oder Hippopotamidae (z.B. Pferd) (Remane *et al.*, 1995).

Innerhalb der Art *Sus scrofa* werden gegenwärtig 32 lokale Unterarten der Wildschweine unterschieden, die in drei Gruppen zusammengefasst werden können. Das in Europa und Nordafrika sowie West- und Mittelasien verbreitete Wildschwein *Sus scrofa scrofa*, das in Indonesien, Japan, China und Ostsibirien verbreitete Bindenschwein *Sus scrofa vittatus* sowie das in Indien vorkommende *Sus scrofa cristatus*. Eine Übergangsform von *Sus scrofa scrofa* und *Sus scrofa vittatus* stellt das Wildschwein des Mittelmeerraums *Sus scrofa mediterraneus* dar. Als Ausgangsform für die heutigen Hausschweinrassen haben die europäischen und asiatischen Wildschweine eine überragende Bedeutung (Benecke, 1994). Haustiere stellen zoosystematisch keine eigene Unterart dar, da sie aus einer Unterart durch Selektion und Kreuzung hervorgegangen sind (Meyer W. *et al.*, 1998), sind jedoch genetisch betrachtet einer Unterart gleichzustellen.

Die Domestikation des Schweins wurde nach archäologischen Funden in Europa in der jüngeren Steinzeit überwiegend nach Schaf und Ziege (Meyer W. *et al.*, 1998) und vor dem Rind betrieben. Auch in China wurden bereits aus der Zeit um 6000 v. Chr. Knochenfunde domestizierter Schweine gefunden (Benecke, 1994). Im Gefolge des Menschen verbreiteten sie sich über die ganze Welt. Im Mittelalter blieben züchterische Verbesserungen bescheiden, da aufgrund des gemeinsamen Weidegangs der Tiere eine gezielte Selektion erschwert wurde. Es wurden bereits seit dem 9. Jahrhundert Herden von bis zu 2000 Tieren gehalten. Das wildschweinähnliche Aussehen der Hausschweine im Mittelalter, z.B. auf Dürers Kupferstich „Der verlorene Sohn“, in Abbildung 1 wird häufig als Hinweis für eine bis zu dieser Zeit vorgenommene Einkreuzung von Wildschweinen in die Schweinebestände angesehen (Sambraus, 1994).



Abbildung 1: Albrecht Dürer: Der verlorene Sohn bei den Schweinen, 1496 (Ausschnitt aus dem Entwurf für den Kupferstich)

Unverkennbare Ähnlichkeit des abgebildeten Hausschweins mit einem Wildschwein.
Quelle: British Museum London (Entwurf), Kupferstichkabinett SMPK, Berlin

Die gezielte Rassezucht setzte erst im 18. Jahrhundert vor allem in England ein. Die erste moderne Schweinerasse hieß Leicester und war eine Kreuzung aus asiatischen, italienischen Schweinen und englischen Landschlägen (Sambras, 1994). Der große Einfluss von asiatischen Hausschweinen auf die europäischen Hausschweinrassen kann noch heute genetisch nachvollzogen werden (Giuffra *et al.*, 2000). Bereits im frühen 19. Jahrhundert wurde die Edelrasse Hampshire gezüchtet, die heute noch als Kreuzungstiere von Bedeutung sind. Davor gab es nur unterschiedliche Landschläge, die den heutigen Anforderungen an die Genetik einer Rasse nicht genügen würden. Die Rassen sind auf unterschiedliche Leistungsmerkmale spezialisiert. Während in den Eberlinien die Schlachtleistung mit hohem Fleisch- und ausgewogenem Fettanteil dominiert, ist es bei den Saulinien die Fruchtbarkeit und Robustheit. Es werden verschiedene Zuchtmethoden angewendet, um die Rassen-Merkmale zu optimieren. Die Reinzucht soll durch Selektion innerhalb der Rasse die Eigenschaften verbessern, während durch die Kreuzungszucht die Vorzüge verschiedener spezialisierter Rassen kombiniert werden sollen. In der Hybridzucht sind bereits beide Elterntiere das Ergebnis einer systematischen Kreuzungen zweier Rassen, die man Hybride nennt (aid, 1997). In den letzten Jahren ist auch die Einkreuzung von Wildschweinen in die spezialisierten Rassen auf neues Interesse gestoßen, z.B. um Rückzüchtungen ausgestorbener Rassen vorzunehmen (Barker, 1994).

In Deutschland sind die vier Rassen Deutsche Landrasse, Piétrain, Deutsches Edelschwein und Leicoma von Bedeutung, die zusammen einen Marktanteil von fast 98 % haben. Die genaue Verteilung des Jahres 1994 ist in der Tabelle 2 aufgeführt (ZDS, 1995).

Tabelle 2: Rassenverteilung in Herdbuch- und Vermehrungsbetrieben in Deutschland im Jahr 1994.
 Ein Anteil von fast 98 % wird durch die vier Rassen Deutsche Landrasse, Piétrain, Deutsches Edelschwein und Leicoma gestellt. Die Daten sind dem ZDS-Jahresbericht 1994 entnommen (ZDS, 1995).











Schweinerasse		Anteil in Deutschland
Deutsche Landrasse (DL)		60,7 %
Piétrain (Pi)		21,8 %
Deutsches Edelschwein (DE)		12,2 %
Leicoma (Lc)		3,1 %
Hampshire (Ha)		0,6 %
Duroc (Du)		0,5 %
Schwäbisch Hällisches Schwein		0,4 %
Angler Sattelschwein / Deutsches Sattelschwein		0,2 %
Bunte Bentheimer		0,1 %
Sonstige z.B. Schwerfurter Fleischrasse		0,4 %

Bild-Quelle: aid-infodienst

1.2 Morphologische Betrachtung (Phänotyp)

Eine Möglichkeit zur Differenzierung von Wild- und Hausschweinen ist die Suche nach Genen, die für die Ausbildung von morphologischen Unterschieden verantwortlich sind. Zwischen Haus- und Wildschweinen existiert eine Reihe solcher Unterschiede, wie z.B. die Fellfarbe, Fellbeschaffenheit (Borsten), Kopfform, Größe, Form des Leibs und der Läufe, Größe der Stoßzähne (Brehm, 1996).

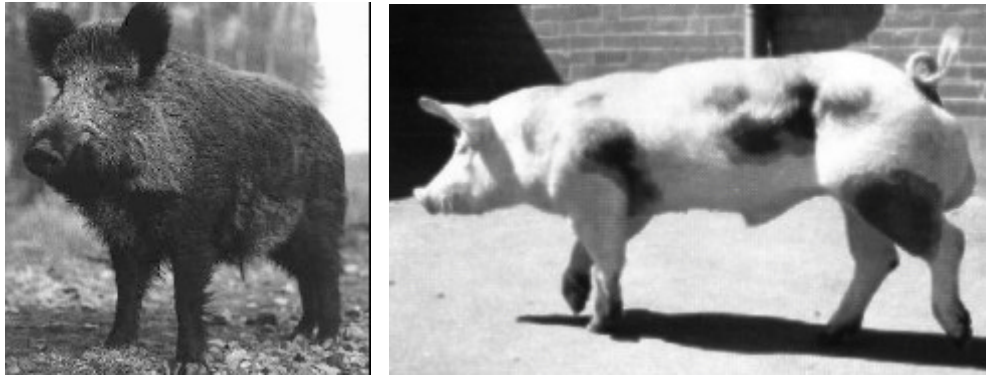


Abbildung 2: Europäisches Wildschwein und Hausschwein der Rasse Piétrain im Vergleich.
Auf den ersten Blick sind zahlreiche morphologische Unterschiede zu erkennen.

Die Möglichkeit der Rückführung eines phänotypischen Merkmals auf ein einzelnes Gen ist jedoch schwierig, da bei der Ausbildung eines Merkmals mehrere Gene bzw. Aktivierung oder Inhibition von Genen eine Rolle spielen können (Våge *et al.*, 1999). Zu beachten ist auch, dass die durch Züchtung entstandene Vielfalt an Hausschweinrassen nicht auf das Einbringen artfremder Gene mit neuen Eigenschaften zurückzuführen ist, sondern auf eine Reduzierung der genetischen Vielfalt auf einheitliche Rasse-typische Merkmale. Die Selektion am Phänotyp wirkt sich nicht nur auf ein bestimmtes Gen aus, sondern auf eine Vielzahl an Genen. So war die Veränderung der Kopfform oder der Fellfarbe sicherlich kein primäres Zuchtziel. Ebenso wenig, wie nur einzelne Gene durch Zucht verändert werden, fallen ganze Gene komplett weg. Es handelt sich stets um Mutationen bzw. genetische Variabilität, die durch geeignete Rekombinationen zu einer veränderten phänotypischen Ausprägung führen. Weiterhin können auf der Ebene der DNA-Sequenz zahlreiche Veränderungen vorhanden sein, die sich in keiner Weise auf den Phänotyp auswirken oder z.B. nur bei bestimmten Umweltbedingungen morphologisch erkennbar sind.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind hinsichtlich der genannten morphologischen Unterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen nur Gene bekannt, die in einem Zusammenhang mit der Körpergröße und der Fellfarbe stehen (Siebel, 2002). Bezüglich der Fellfarbe sind Untersuchungen veröffentlicht, die einen Einfluss bei der Entstehung der Fellfarbe bei

Schweinen haben. Danach sind für die Änderung der Fellfarbe von schwarz zu rosa, die auf dem Wegfall der Produktion einiger Melanine beruht, verschiedene Veränderungen des Genotyps verantwortlich (Kijas *et al.*, 1998). Nicht nur Wildschweine haben ein schwarzes Fell, auch einige Hausschweinrassen. Schweine der Edelfrassen DL, DE, Lc sowie die Belgische Landrasse haben keine Pigmentation, während Pi und Ha teilweise und Du vollständig schwarze Borsten aufweisen. Im Gegensatz zu den unregelmäßig gefleckten Pi weisen Ha einen charakteristischen weißen Streifen auf. Form und Farbe des Streifens sollen auf unterschiedliche Mutation im gleichen genetischen Locus zurückzuführen sein (Giuffra *et al.*, 1999). Kreuzungsversuche haben gezeigt, dass die weiße Farbe dominant vererbt wird (Johansson *et al.*, 1992 und 1997; Pielberg *et al.*, 2002).

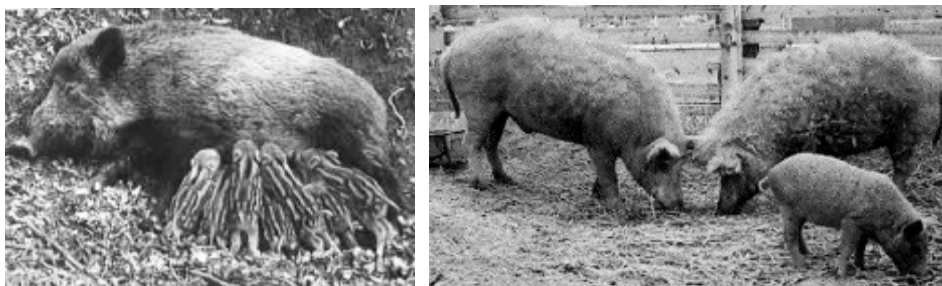


Abbildung 3: Links: Frischlinge von Wildschweinen. Rechts: Wollschweine

Frischlinge weisen für junge Wildschweine charakteristische Streifen auf dem Fell auf. Die Gene, die im juvenilen Stadium für die Ausbildung der gestreiften Fellfärbung von Wildschweinen verantwortlich sind, sind noch nicht bekannt. Von den Hausschweinrassen weist nur das Wollschwein dieses Merkmal auf (Sambraus, 1994). Die Bedeutung der Wollschweine für die menschliche Ernährung hat seit dem Krieg aufgrund des hohen Fettanteils der Tiere so rapide abgenommen, dass sie heute zu den vom Aussterben bedrohten Rassen gehören.

Auch bei anderen Tierarten, wie z.B. Hunden, Pferden und Rindern sind die genetischen Grundlagen für die Entstehung der Fellfarbe hinsichtlich der Zucht oder Identifizierung von Rassen untersucht worden (Laukner, 1998; Newton *et al.*, 2000). Für die Färbung zeigen sich einheitlich Melanin-Derivate verantwortlich, die über verschiedene Bildungsmechanismen erzeugt werden (siehe unter 2.1.2, Seite 17). Es sind zahlreiche Komponenten und Reaktionsschritte an der Bildung beteiligt, so dass unterschiedliche Färbungen verschiedene biochemische und somit mehrere genetische oder umweltbedingte Ursachen haben können.

1.3 Genetische Betrachtung (Genotyp)

Die Sequenzierung aller bekannten DNA-Sequenzen bei mehreren Haus- und Wildschweinen übersteigt den zeitlichen Rahmen einer Doktorarbeit. Daher muss eine Auswahl von Sequenzen erfolgen, die untersucht werden sollen.

Die einfachste aber bislang selten angewandte Möglichkeit zur Wahl der Zielsequenz ist, dass die Funktion des Gens in einem bekannten Zusammenhang zu charakteristischen morphologischen Eigenschaften steht. Dies ist auch beim Menschen bei den meisten Genen noch nicht der Fall, obwohl das menschliche Genom bereits vollständig sequenziert worden ist. Für die Untersuchungen wurden die Gene des Melanocortin-Rezeptor-1-Gens und des Tyranosinase-Gens ausgewählt, die in Bezug zu der Fellfarbe stehen sollen (Siebel *et al.*, 2000) sowie das Growth Hormone-Gen, das in Bezug zur Körpergröße steht (Das *et al.*, 1996).

Neben Genen, die in Relation zu den morphologischen Unterschieden von Haus- und Wildschweinen zu bringen sind, könnten sich auch Bereiche der DNA zur Differenzierung von Unterarten eignen, die weniger stark konserviert sind. Da die zu erwartenden DNA-Sequenzunterschiede zwischen den Unterarten geringer als zwischen den Arten sind, ist eine hohe Sequenzvariabilität wichtig. Dies trifft in der Regel für DNA-Bereiche zu, die nicht für Proteine codieren. Diese Bereiche können von den Gen-codierenden Bereichen durch das Fehlen von Start- und Stopp-Codons identifiziert werden. Mutationen in Genen generativer Zellen können in der nächsten Generation zur Veränderung der Proteinsequenz und damit zu veränderten Eigenschaften des exprimierten Proteins führen. Bedeuten Veränderungen einen Selektionsnachteil für das Lebewesen, werden sie sich kaum in einer Population durchsetzen können. Mutationen in nicht-codierenden DNA-Bereichen haben in der Regel keine Auswirkungen auf den Phänotyp und sind keiner Selektion unterworfen. In diesen DNA-Bereichen ist eine größere Variabilität der DNA-Sequenz zu erwarten als in Genen (Karlson, 1988).

Eine weitere Möglichkeit zur DNA-analytischen Untersuchung sind Methoden, die nicht nur einen bestimmten DNA-Bereich zur Identifizierung verwenden, sondern das ganze Genom dafür heranziehen. Dazu zählt die Methode der „randomly amplified polymorphic DNA“ (RAPD), der „amplified-fragment length polymorphism“ (AFLP), des RFLP-Fingerprints der genomischen DNA und die Heteroduplexanalyse der mRNAs oder mtDNA (Elphinstone und Baverstock, 1997). Diese Methoden sind potentiell geeignet, um Marker für bestimmte analytische Fragestellungen zu finden, die durch nähere Charakterisierung für eine robuste Analytik, wie z.B. eine Taxon-spezifische PCR, verwendet werden können.

Vergleicht man die Problematik der Unterscheidung der Rassen bei Schweinen und bei Hunden oder Pferden, wo diese bei besonders wertvollen Tieren zum Zweck des Abstammungsnachweises für Zuchttiere durchgeführt wird, werden folgende Unterschiede deutlich: Beim Schwein wird nur das Hausschwein einem kontinuierlichen Selektionsdruck durch den Menschen ausgesetzt, der wesentlich stärkere Veränderungen hervorbringt, als die überwiegend natürliche Selektion beim Wildschwein. Während der Genpool der jeweiligen Hausschweinrasse verarmt, bleibt beim Wildschwein eine hohe Variabilität erhalten.

Bei der Suche nach Unterschieden im Genotyp von Haus- und Wildschweinen ist eine wichtige Voraussetzung, dass bereits DNA-Sequenzen in Datenbanken oder Publikationen zur Verfügung stehen. Während das humane Genom überwiegend sequenziert ist, hat die Sequenzierung der DNA von Nutztieren erst begonnen. Das erste Projekt, das sich mit der Sequenzierung des Nutztiergenoms befasst, ist eine Kooperation von China und Dänemark. Das auf mehrere Jahre angelegte Projekt soll das auf drei Milliarden Basenpaare geschätzte Schweinengenom sequenzieren (AgBiotechNet, 2000). Von den meisten bereits bekannten Abschnitten des Genoms von Nutztieren liegen nur DNA-Sequenzen von einem Individuum vor. Daher erlauben Sequenzvergleiche oft keine Rückschlüsse auf die Variabilität eines DNA-Bereiches zwischen verschiedenen Unterarten. Der Vergleich zwischen der DNA-Sequenz von Mensch und Schwein kann nur ein grober Anhaltspunkt für die Identifizierung von Bereichen mit hoher Variabilität sein. Daher können auf diesem Weg nur geeignete Sequenzen identifiziert werden, bei denen eine ausreichende Anzahl an Individuen sequenziert worden sind.

2 AUSWAHL DER ZIELSEQUENZEN

2.1 Analyse Protein-codierender DNA (Gene)

Nur ein kleiner Teil der gesamten DNA von ca. 3 Milliarden Basenpaaren codiert für Proteine. Daneben gibt es einige Bereiche, die z.B. für RNAs codieren oder sonstige Steuerungsfunktionen haben (Watson *et al.*, 1993). Diese Bereiche unterliegen weniger Veränderungen durch Mutationen als nicht codierende Bereiche, wobei deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Daher ist die Definition, was ein Gen ist noch uneinheitlich und vorläufig. Nach Albert *et al.* (2002) ist ein Gen eine DNA-Region, die eine bestimmte Erbeigenschaft kontrolliert, welche in der Regel mit einem einzelnen Protein oder einer RNA korrespondiert. Dies schließt die komplette funktionelle Einheit, also die codierende DNA-Sequenz, die nichtkodierende DNA-Sequenz und die Introns ein.

2.1.1 CYTOCHROM B-GEN

Zur Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen unter Tieren werden von Molekularbiologen große Teile oder die gesamte mitochondriale DNA (mtDNA) (Chen und Leibenguth, 1995; Matthee und Robinson, 1995; Sankoff *et al.*, 1992; Zehner *et al.*, 1998; Tamate und Tsuchiya, 1995) oder nur einzelne Gene der mtDNA, wie z.B. das *cytB*-Gen (Irwin *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1998) analysiert. Auch zur Bestimmung des Verwandtschaftsgrades von chinesischen Hausschweinen und Wildschweinen wurde die mtDNA untersucht (Huang *et al.*, 1999). Hierzu wurde die mtDNA mit zahlreichen Restriktionsenzymen behandelt und die entstehenden Schnittmuster ausgewertet.

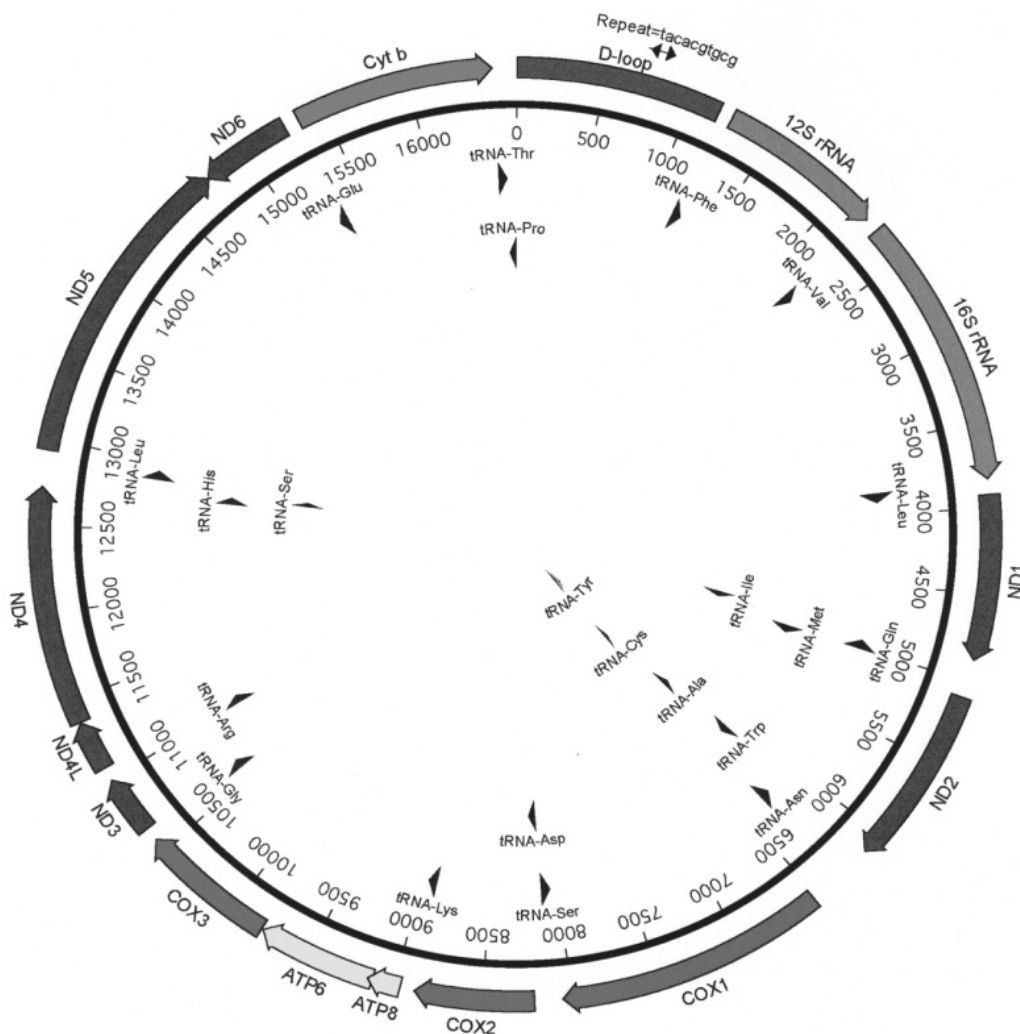


Abbildung 4: Mitochondriale DNA (mtDNA) des Schweins (Lin *et al.*, 1999 sowie Ursing und Arnason, 1998)

Die mtDNA enthält keine Introns. Der einzige nicht codierende Bereich ist der D-Loop. Neben den Sequenzen für die t-RNAs und die 12S sowie die 16S rRNA findet man die Gene für die Proteine Cytochrom C Oxidase, die ATP Synthase, NADH Dehydrogenase und Cytochrom B. Das mitochondriale Genom des Schweins ist mit 16613 Bp ein wenig größer als das der Ratte mit 16298 Bp und das des Menschen mit 16569 Bp (Gadaleta *et al.*, 1989).

Die mtDNA hat gegenüber der nukleären DNA den Vorteil, dass keine Allele existieren, da sie unabhängig von den Chromosomen fast ausschließlich maternal an die Nachkommen

weitergegeben wird. Dadurch lassen sich Abstammungen leichter zurückverfolgen und es tritt keine Heterozygotie auf, so dass jedes Individuum nur eine Sequenzabfolge genomischer DNA haben sollte. In Ausnahmefällen ist es aber möglich, dass neben dem Wildtyp aufgrund von Mutationen in ein und derselben Zelle auch Mitochondrien mit unterschiedlicher Sequenz auftreten. Im Gegensatz zur nukleären DNA existieren im mitochondrialen Genom keine Introns und mit Ausnahme des Displacement-Loops keine längeren nicht codierenden Basenfolgen (Taanman, 1999). Der genetische Code unterscheidet sich teilweise von dem des Kerns, wie in Tabelle 3 dargestellt. Im Mitochondrium gibt es außerdem keine Histone, die im Zellkern die genomische DNA stabilisieren und schützen.

Tabelle 3: Mitochondrialer Code
Unterschiedliche Codierung durch mitochondriale bzw. nukleäre tRNAs

Codon	Nukleärer Code	Mitochondrialer Code
UGA	STOP	Trp
AUA	Ile	Met
AGA	Arg	STOP
AGG		

Ein Problem bei mitochondrialen Nachweissystemen ist die Möglichkeit des Vorhandenseins von Pseudogenen. Dies sind Teile des mitochondrialen Genoms, die ins nukleäre Genom translokalisiert wurden (Collura und Stewart, 1995; Mirol *et al.*, 1999). Dies wurde bei der Hauskatze bei bis zu 7,9 kBp großen Stücken und in mehrfachen Kopien nachgewiesen (Lopez *et al.*, 1994). Bei der Amplifikation mtDNA werden die Kopien im Zellkern koamplifiziert. Diese können unterschiedliche Längen oder bei gleicher Länge unterschiedliche Restriktionsmuster aufweisen. Zur Vermeidung dieser Problematik kann eine spezielle, die mitochondriale DNA anreichernde Extraktionsmethode verwendet werden (Burgener und Hübner, 1998). Die meisten tierischen Zellen enthalten in Abhängigkeit von ihrer Stoffwechselaktivität mehrere Mitochondrien. Ein Mitochondrium kann mehrere Kopien des mitochondrialen Genoms enthalten. Daher existiert die gleiche mtDNA-Sequenz in jeder Zelle mehrfach (Lewin, 1997). Das resultiert in einer hohen Sensitivität der Methode, die auf der Amplifikation von mtDNA basiert. Andererseits ist dadurch eine Quantifizierung über mitochondriale Sequenzabschnitte nur sehr schwer möglich. Bei Proben, die aus verschiedenen Tierarten zusammengesetzt sind und deren Bestandteile möglicherweise noch verschiedene Gewebetypen, wie z.B. Leber und Fett enthalten, ist ein Rückschluss von der Anzahl der mitochondrialen Genome auf den Anteil einer Tierart in der Probe nur sehr ungenau möglich.

Beide Stränge der mtDNA enthalten Codierungen von Genen. Der Guanin-reiche innere H-Strang ist für die Codierung von 12 Atmungskettenproteinen, der ribosomalen RNA (rRNA) und von 14 Transfer-RNAs (tRNA) zuständig. Der äußere cytosinreiche L-Strang enthält die restlichen 8 der 22 mitochondrialen tRNA-Gene und eines von 13 Untereinheiten mtDNA-codierten Proteinen der vier unterschiedlichen Komplexe für die oxidative Phosphorylierung. Alle weiteren für die Funktionalität des Mitochondriums und der Atmungskette notwendigen Proteine sind kerncodiert. Viele Stoffwechselerkrankungen des Menschen beruhen auf mitochondrialen Mutationen, am häufigsten auf Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) (Schapira und Cock, 1999). Die einzelnen Protein- und rRNA-codierenden DNA-Sequenzen sind durch zwischengeschaltete tRNA-Gene voneinander getrennt (Ojala *et al.*, 1981).

Zur Bestimmung der Tierart in Lebensmitteln hat sich die DNA-analytische Methode von Rolf Meyer *et al.* (1995) über einen 359 Bp großen DNA-Sequenzabschnitt des Cytochrom B-Gens (*cytB*-Gens) bereits etabliert. Der gewählte DNA-Abschnitt beinhaltet einen interspezifisch variablen Bereich, der von relativ konservierten Bereichen flankiert wird. In den konservierten Bereichen können die für mehrere Tierarten einzusetzenden Universalprimer zur Durchführung der PCR binden, während der variable Bereich durch die Sequenzheterologien über weitere analytische Verfahren wie RFLP-Analyse oder Sequenzierung eine Bestimmung der Tierart ermöglicht.

Die Differenzierung zwischen Wild- und Hausschwein über diesen Sequenzabschnitt des *cytB*-Gens über RFLP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *HinfI* wurde in der Literatur beschrieben (Meyer R. *et al.*, 1995). Dieses Enzym schneidet die amplifizierte DNA-Sequenz des Wildschweins einmal, so dass Fragmente der Größe 161 und 198 Bp erhalten werden, während die Sequenz des Hausschweins nicht geschnitten wird und das Amplifikat von 359 Bp erhalten bleibt. Bei einigen Referenzproben führte diese Analytik jedoch zu keinen unterschiedlichen Restriktionsmustern zwischen Wild- und Hausschweinen (Meyer G *et al.*, 1997).

2.1.2 MELANOCORTIN-REZEPTOR-1-GEN (MC1R)

Melanin ist ein Pigment, das für eine braune oder schwarze Farbe in der Retina, Iris, Haut und Haar der meisten Säugetiere verantwortlich ist. Die Melanin-Synthese erfolgt in Pigmentzellen oder Melanozyten. Der erste bekannte biochemische Schritt ist die Oxidation von Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) mit anschließender Dehydrogenisierung zu Dopaquinon (Lerner und Fitzpatrick, 1950). Die Schritte sind in Abbildung 5 dargestellt. Bei der Bildung sind verschiedene Tyrosinase-Derivate beteiligt, wobei Tyrosinase mit seinen drei katalytischen Funktionen eine Grundvoraussetzung für die Bildung von Melanin ist. Auch der Ausfall anderer Enzyme kann zu einer Störung der Melanin-Produktion führen (Sakai *et al.*, 1997). Es werden zwei Arten von Melaninen gebildet, das braune oder schwarze Eumelanin und das gelb-rote Pheomelanin (Korner und Pawelek, 1982).

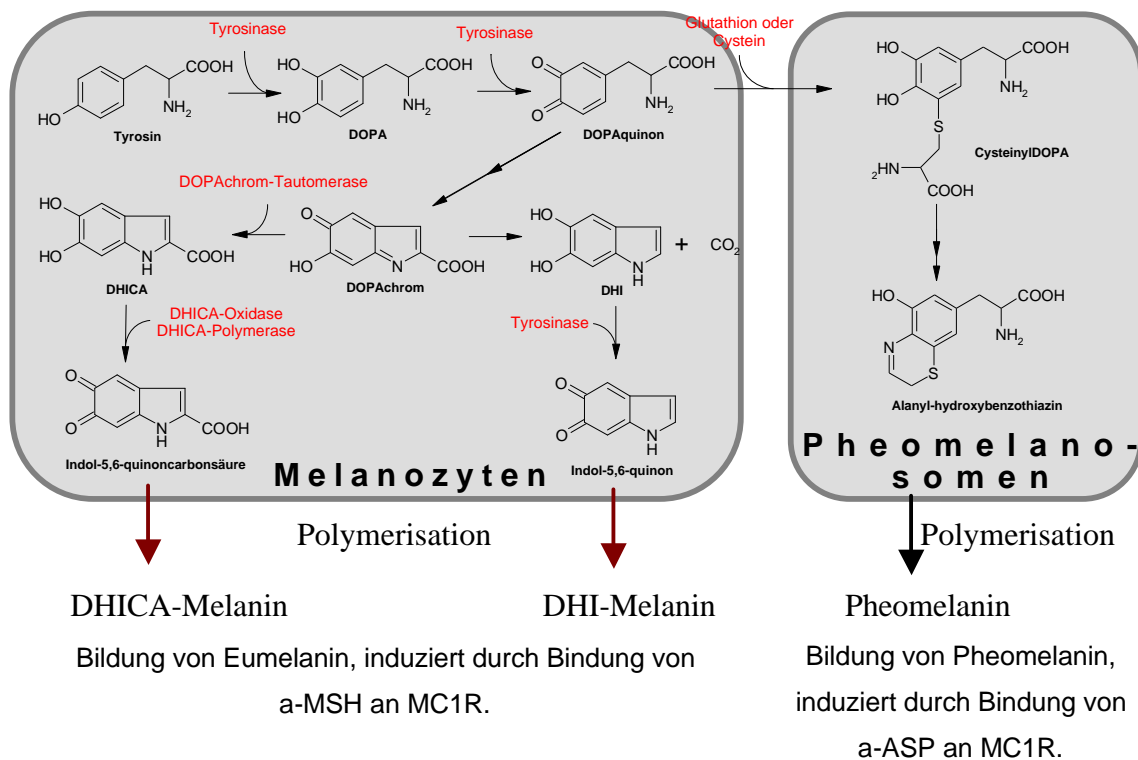


Abbildung 5: Biosynthese verschiedener Melanine aus Tyrosin.

Aus Tyrosin wird mit Hilfe von Tyrosinase DOPAquinon als Ausgangsprodukt für die Melaninsynthese gebildet. Dabei fungiert es zunächst als Tyrosin-Hydroxylase und anschließend als DOPA-Oxidase. Weiterhin katalysiert das Enzym als DHI-Oxidase die Bildung von DHI-Melanin (Sakai *et al.*, 1997).

Neben den Enzymen spielen aber auch die Rezeptoren der Melanozyten für die Synthese von Melanin eine wichtige Rolle. Der MC1-Rezeptor (früher als MSH-Rezeptor bezeichnet) auf der Oberfläche der Melanozyten stimuliert die Eumelanin-Synthese, wenn das α-Melanocyten-stimulierende Hormon (α-MSH) oder das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) an ihn bindet (Gilchrist *et al.*, 1996; Haskell-Luevano *et al.*, 1999). Zyklisches AMP (cAMP) erhöht den melanogenen Effekt, den α-MSH und ACTH auf MC1R bewirken. Die Synthese von cAMP spielt somit ebenfalls eine Rolle bei der Ausprägung der Hautfärbung

(Buscà und Ballotti, 2000). Alpha-MSH induziert die Synthese von Eumelanin in follikulären Melanozyten, was in einer schwarzen Haarfärbung resultiert. Bei Fischen, Amphibien und Reptilien ist dieses Hormon für schnelle Farbänderungen verantwortlich. Bei Bindung des Agouti Signal Proteins (a-ASP) wird die Eumelanin-Synthese inhibiert und die Pheomelanin-Synthese in den Pheomelanosomen induziert. Eine UV-Bestrahlung der Zellen resultiert in einer erhöhten a-MSH und ACTH-Bildung und somit in vermehrter Eumelanin-Synthese (Abdel-Malek *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1999). Ein weiteres Protein, das für die Eumelanin/Pheomelanin-Synthese verantwortlich ist, ist das Proopiomelanocortin-Protein (POMC) als Precursor für die Familie der Melanotropen Hormone ACTH und a-MSH (Krude *et al.*, 1998). Diese Peptid-Familie hat jedoch eine breite biologische Funktionalität. Sie ist neben der Beteiligung an der Pigmentierung auch in Aktivitäten der Neuroendokrinen, der Thermoregulation, des Verstandes und Verhaltens, des Fettverdaus und der Immunomodulation involviert. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Expression von POMC-Derivaten in verschiedensten Zelltypen erfolgt (Böhm *et al.*, 1999). Eine veränderte Expressionsrate oder ein modifiziertes Epitop hätte daher weitreichendere Folgen als nur das Ausbleiben der Melaninbildung. Die Unfähigkeit des MC1R durch a-MSH aktiviert zu werden oder eine Überexpression von a-ASP in Haarfollikeln resultiert in einer hellen (gelblichen) Fellfärbung (Abdel-Malek, 1996). Insgesamt ist die Bildung der Fellfarbe eine Interaktion zahlreicher Rezeptoren und Antagonisten, bei denen auch Mutationen der aktiven Zentren des MC1-Rezeptors eine wichtige Rolle spielen (Cone *et al.*, 1996). Kijas *et al.* (1998) führen die unterschiedliche Ausprägung der Fellfarbe u.a. bei Haus- und Wildschweinen auf unterschiedliche Genotypen des *mc1r*-Gens zurück. Dieses Gen wird daher in dieser Arbeit bei verschiedenen Haus- und Wildschweinen sequenziert werden, um festzustellen, ob die auftretenden Genotypen charakteristisch für Schweinerassen mit unterschiedlicher Fellfarbe sind.

2.1.3 TYROSINASE-GEN (*tyr*-GEN)

Bei drei der unter 2.1.2 aufgeführten Reaktionsschritten der Biosynthese von Melaninen ist Tyrosinase als Schlüsselenzym beteiligt. Albinismus wird verursacht durch einen Defekt in dieser Melanin-Produktion. Der Grad der Depigmentierung bis hin zum vollständigen Verlust steht in Abhängigkeit zu der Anzahl an vorhandenen Mutationen. Die meisten Fälle von vollständigem Albinismus bei höheren Säugetieren konnten auf einen Defekt im *tyr*-Gen zurückgeführt werden. Beim Vergleich von Hühnern der Rasse Leghorn (weiß) und der Rasse Black Silky (schwarz) konnte neben zwei stillen Mutationen eine Deletion von sechs Nukleotiden an Position 817 des *tyr*-Gens gefunden werden (Tobita-Teramoto *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Erkenntnisse erscheint es Erfolg versprechend, die Struktur-relevanten Abschnitte des Gens bei Haus- und Wildschweinen zu vergleichen.

2.1.4 IMMUNOREZEPTOR DAP10-GEN (*DAP10*-GEN)

DAP10 hat einen offenen Leserahmen von 324 Bp. Es ist aufgebaut aus fünf Exons mit vier Introns was zu einer Gesamtlänge zwischen Methionin-Startcodon zum Stopp-Codon von 3,1 kBp führt (Yim *et al.*, 2000). Bei diesem für die Immunabwehr von Granular Lymphozyten wichtigen Gen sind große Protein-Sequenzunterschiede zwischen Menschen, Maus und Schwein vorhanden. Fast 30 % der Aminosäuren sind in diesem Gen zwischen einem Schwein und dem Menschen oder einer Maus unterschiedlich. Das ist im Vergleich zu dem geschätzten Unterschied der DNA-Sequenz zwischen dem gesamten Genom von Mensch und Schwein mit etwa 10 % sehr viel. Dabei ist auch zu beachten, dass auf DNA-Ebene viele stille Mutationen an einer Wobble-Position vorhanden sind, die sich nicht in der Aminosäuresequenz auswirken.

2.1.5 GROWTH-HORMON (GH-GEN)

Die Domestikation der Wildschweine ging nahezu immer einher mit einer Verminderung der Größe, was auch bei heutigen Kreuzungen von Haus- und Wildschweinen beobachtet werden kann (Knott *et al.*, 1998). Das bekannteste Protein, das für die Größe verantwortlich ist, ist das Wachstumshormon (GH). Ein weiteres Protein, für das ein Zusammenhang zwischen Fettanteil oder Wachstumsrate und dem Genotyp festgestellt werden konnte, ist der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) (Kim *et al.*, 2000). Das MC4R gehört neben dem oben behandelten MC1R zu einer Gruppe von fünf Melanocortin Rezeptor Subtypen, die bisher in verschiedenen Tieren und dem Menschen identifiziert werden konnten. Während MC1R in die Pigmentierung eingebunden ist, ist MC4R am Energiehaushalt beteiligt (Haskell-Luevano *et al.*, 1999). Auf Basis des *gh*-Gens wurde bereits ein Schwein-spezifisches PCR-System

entwickelt (Meyer R. *et al.*, 1993). Durch Verwendung eines Taxon-spezifischen Primerpaares in der PCR werden Haus- und Wildschweine durch ein PCR-Amplifikat bei unterschiedlich stark verarbeiteten Lebensmitteln identifiziert. Die getesteten andere Tierarten erzeugen kein Amplifikat (Betz *et al.*, 1998). Die Untersuchung der DNA-Sequenz des *gh*-Gens hinsichtlich vorhandener Unterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen (Kirkpatrick *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1998) kann aufgrund zahlreich vorhandener Sequenzdaten in den Datenbanken erfolgen.

2.1.6 RYANODIN-GEN

Der Skelettmuskel Ryanodin-rezeptor (RYR1) gehört zur Familie der Calcium-Kanäle, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Das *ryr1*-Gen ist eins der größten bisher identifizierten Gene beim Schwein mit 15253 Nukleotiden im Open Reading Frame (ORF). Das Gen ist unterteilt in ca. 110 Exons, das von Introns mit insgesamt ca. 40 repetitiven Abschnitten unterbrochen wird (Wen *et al.*, 1996). Die repetitiven Sequenzabschnitte mit einer mittleren Länge von 259 Bp gehören zu den Schweine-spezifischen DNA-Elementen wie die Short interspersed elements (SINE) (Frengen *et al.*, 1991; Miller und Archibald, 1993). Das RYR1 wird in Zusammenhang mit der malignen Hyperthermie gebracht (Mickelson *et al.*, 1992), die selten bei Menschen (Otsu *et al.*, 1992), häufiger bei Hausschweinen durch Temperaturanstieg zum Tode führt (Brenig und Brem, 1992). Besonders in Stress-Situationen, wie sie beim Transport oder vor der Schlachtung eintreten können, führt diese Eigenschaft zu Verlusten bei Schlachtvieh (Schmoelzl *et al.*, 1996). Nicht alle Hausschweinrassen weisen diese genetische Prädisposition auf. Bei der stressempfindlichen Variante ist die Aminosäure Arginin durch Cytosin aufgrund der Änderung des Codons von CGC nach TGC durch Punktmutation ausgetauscht. Ein Züchtungsziel bei der Schweinezucht ist, dieses Merkmal aus den Rassen zu entfernen (Schweer, 1986). Die Identifizierung dieser Mutation ist somit für züchterische Zwecke wichtig (Maak, 2001) und kann z.B. über PCR-SSCP erfolgen (Nakajima *et al.*, 1996), als Marker für eine Differenzierung von Haus- und Wildschweinen ist sie jedoch ungeeignet.

2.2 Analyse von nicht-codierenden DNA-Bereichen

Der Anteil an nicht-codierender DNA im Säugetier-Genom ist sehr hoch, wie das Humane-Genom-Projekt beim Menschen zeigte (Collins *et al.*, 2003). Da in der Regel aber codierende Sequenzen von Interesse sind, sind nur wenige nicht-codierende Bereiche des Schweine-Genoms bekannt. Neben dem D-Loop sind das vor allem repetetive Sequenzabschnitte und Introns, die bei der Sequenzierung von Genen miterfasst werden.

Der Sequenzunterschied zwischen gezüchteten Individuen einer Art beträgt durchschnittlich ein Basenaustausch pro 1000 Basenpaaren (Dodgson *et al.*, 1997). Die Unterschiede sind in nicht-codierenden DNA-Bereichen größer als in Genen und in hypervariablen Bereichen, wie z.B. repetetiven Sequenzabschnitten am größten (Nijman, 1999), da entstehende Mutationen oft keine Reduktion der Überlebensfähigkeit des Individuums bedeuten.

2.2.1 DISPLACEMENT-LOOP (D-LOOP)

Die D-Loop-Region ist ein DNA-Bereich im mitochondrialen Genom (s.o.), die nicht für eine Aminosäuresequenz codiert und deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (Steinborn *et al.*, 1998). Eine Fehlfunktion dieser Region wurde sogar zeitweise mit dem Ausbruch der Krankheit Scrapie in Zusammenhang gebracht (Frýdl und Závodská, 1992). Man weiß jedoch, dass der D-Loop wichtige Regulationsstrukturen für die Transkription und die Replikation beinhaltet (Clayton, 1987; King und Low, 1987; Nakamichi *et al.*, 1998).

Die Replikation der mtDNA beginnt mit dem H-Strang und geht von dessen Startpunkt (Origin) im D-Loop aus. In diesem Bereich bildet sich eine vom Ursprung in Replikationsrichtung reichende Tripel-DNA-Struktur aus, wobei sich ein kurzes, sogenanntes 7S-DNA-Molekül mit dem L-Strang paart. Um den H-Strang zu replizieren, wird diese 7S-DNA durch eine Polymerase weiter verlängert (Clayton, 2000). Die Neusynthese des Stranges erfolgt im Urzeigersinn bis zur Freisetzung der Initiationssequenz des L-Stranges, der nun in Gegenrichtung ebenfalls repliziert werden kann. Folglich geschieht der Vorgang bidirektional und asynchron. Die Transkription geht ebenfalls vom D-Loop aus, wo jeder der beiden DNA-Stränge seinen eigenen separaten Promotor besitzt. Anders als im nukleären Genom wird im Mitochondrium ein den ganzen Strang umfassendes RNA-Molekül transkribiert. Der D-Loop enthält auch kurze 10-mer Tandemrepeats, die bei verschiedenen Tieren zu unterschiedlich langen D-Loop-Sequenzen führen können (Dufresne *et al.*, 1996; Ghivizzani *et al.*, 1993).

Von der D-Loop-Region gibt es zahlreiche veröffentlichte Sequenzen. Ein Vergleich der Sequenzen zwischen verschiedenen Tierarten zeigt die große Variabilität dieses DNA-Abschnitts. Dies betrifft nicht nur Punktmutationen sondern auch größere Bereiche, die

deletiert oder insertiert worden sind. Auch Tiere verschiedener Rassen einer Art weisen untereinander im D-Loop eine höhere Variabilität auf (*Okumura et al., 1996 und 2001*). Neben den hoch variablen Bereichen existieren im D-Loop auch konserviertere Bereiche (*Saccone et al., 1991; Takeda et al., 1995*), die als Primer Bindungsregionen geeignet sind. Untersuchungen mit den Restriktionsenzymen *HincII* und *HaeIII* zeigten zahlreiche Polymorphismen im D-Loop-Bereich, die jedoch nicht charakteristisch für bestimmte Hausschweinrassen waren (*Davoli et al., 1995*). Untersuchungen des D-Loops mittels SSCP zeigten, dass aufgrund der nahen Verwandtschaft von Haus- und Wildschwein über diese Methode keine Diskriminierung möglich ist (*Rea et al., 1996*).

2.2.2 REPETITIVE SEQUENZEN

Repetitive Sequenzabschnitte mit Wiederholungen von DNA-Sequenzen werden zur Bestimmung der Proben-Identität verwendet. Diese Methode wird überwiegend zur Erstellung von Abstammungslinien bzw. Stammbäumen von Zuchttieren wie Pferden oder Hunden verwendet (*Charlesworth et al., 1994*). Weiterhin werden sie zur Erforschung der Herkunft von domestizierten Tieren verwendet, um festzustellen, welche Anteile an Wildtypen bei der Züchtung eingeflossen sind (*Forbes et al., 1995*). Werden die repetitiven Abschnitte in der PCR amplifiziert, ist eine Speziesdifferenzierung über die Länge des erhaltenen Amplifikats bzw. über die Anzahl der Wiederholungen möglich (*Rikke et al., 1991; Buntjer und Lenstra, 1998*). Wird die genomische DNA über Liganden-Elektrophorese aufgetrennt, treten repetitive Bereiche als Spots aus der DNA-Wolke heraus (*Buntjer et al., 1995; Schmidt et al., 1997*). Diese Bereiche können als Sonden für einen Nachweis mittels Hybridisierung dienen (*Janssen et al., 1998*). Für diese Arbeit wurde der DNA-Mikrosatellit S0602 mit repetitiven Bereichen ausgewählt, von dem ein GenBank-Eintrag vorhanden war.

In der Forensik werden zur Überführung von Tätern oder zum Nachweis von Vaterschaftsverhältnissen längere repetitive Bereiche der DNA amplifiziert und mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Schnittmuster sind Individuen-spezifisch, die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen gleicher Eltern identische Muster aufweisen, liegt je nach Methode zwischen 10^{-8} und 10^{-14} . Zwischen einem Elternteil und der filialen Generation sind ca. 50 % der Fragmente identisch (*Fey, 1989*). Diese Analysenmethode lässt nur die Aussage zu, ob zwei Proben identische Muster aufweisen und daher vom gleichen Individuum stammen oder nicht. Bei geeigneter Versuchsführung ist die Aussage möglich, dass zwei Proben von zueinander sehr nahen Verwandten stammen. Für die Unterscheidung von Rassen ist die Methode nicht geeignet, da die vielfältigen Individuen der einzelnen

Rassen bereits zu große Unterschiede aufweisen werden und daher kein rassetypisches Muster bilden.

2.3 Analyse des gesamten Genoms

2.3.1 RAPD-PCR

Die extrahierte Proben-DNA wird mit kurzen unspezifisch bindenden Primern zufällig vervielfältigt. Kurze Primer von ca. 10 Bp Länge binden an jede Tierart, in der Regel vielfach pro Genom, so dass in der PCR eine größere Anzahl an Banden entstehen. Durch die Länge der Primer, die Annealingtemperatur, die Magnesiumchloridkonzentration, die Zyklenzahl und die Kombination verschiedener Primer kann die Anzahl der Banden auf das gewünschte Maß eingestellt werden. Die Primer sollten aber keine Primer-Dimere oder Hairpins bilden und ein GC-Gehalt von 50 % aufweisen. Sequenzunterschiede in den Primer-Bindungsregionen oder größere Insertionen bzw. Deletionen zwischen den Bindungsbereichen können durch unterschiedlich lange und unterschiedlich viele DNA-Fragmente identifiziert werden. RAPD-Primer werden vor allem dort angewendet, wo keine Sequenzinformationen bekannt sind, bzw. Sequenzunterschiede im Genom gesucht werden. RAPD-Primer eignen sich z.B. zur Feststellung des Grades an Polymorphismen zwischen verschiedenen Züchtungslinien von Pflanzen (Tinker *et al.*, 1993). Die RAPD wird zur Ermittlung des Umfangs an genetischen Veränderungen zwischen Zuchtlinien oder Populationen (Gouin *et al.*, 2001) bzw. der genetischen Distanz zwischen Taxons über Cluster-Analyse verwendet. Eine direkte Identifizierung des Taxons wird nicht vorgenommen. Einzelne Punktmutationen werden in der Regel nicht zu verschiedenen Amplifikationsmustern führen. In dieser Arbeit werden RAPD-Primer verwendet, um die Heterogenität zwischen den Haus- und Wildschweinindividuen festzustellen, sowie DNA-Bereiche zu finden, die hauptsächlich bei einer bestimmten Unterart vorkommen. Die Sequenz dieses Amplifikats könnte dann nachfolgend bestimmt werden. Es wurden verschiedene für Tierarten in der Literatur beschriebene Primer verwendet (Dodgson *et al.*, 1997). Auch für die Tierartenidentifizierung wurden RAPD-Primer verwendet, wobei die Auswertung der Muster schwieriger als bei der spezifischen PCR ist und das System nicht für stark verarbeitete Produkte geeignet ist (Martinez und Malmheden Yman, 1998, Perez *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1997).

2.3.2 AMPLIFIKATIONS-FRAGMENTLÄNGEN-POLYMORPHISMUS (AFLP)

Die genomische Proben-DNA wird mit zwei beliebigen Enzymen, die kohäsive Enden entstehen lassen, geschnitten und an die Enden kurze dsDNA mit kompatiblen Enden und von bekannter Sequenz ligiert. An die ligierten DNA-Abschnitte lagern sich Primer an, die diese

Restriktionsfragmente in einer PCR amplifizieren. Die Primer sind fluoreszenzmarkiert und können nach Auftrennung über Kapillarelektrophorese detektiert werden. Somit ist auch die Verwendung unterschiedlich markierter Primer mit unterschiedlichen Sequenzendungen möglich. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass für die Untersuchung einer beliebigen Tierart keine besonderen Primer oder Restriktionsenzyme notwendig sind. Es können Unterschiede in der genomischen DNA identifiziert werden, deren Lage und Sequenz nicht bekannt sind (Savelkoul *et al.*, 1999).

Die entstehenden Bandenmuster können jedoch sehr komplex sein und gerade bei Mischungen verschiedener Tiere und Pflanzen, wie sie in Lebensmitteln oft vorkommen, können schwer auszuwertende Muster entstehen. Eine bei der Verarbeitung von Lebensmitteln zu erwartende Degradation der DNA führt bei der AFLP und der RNA-Heteroduplexanalyse (Dorrock, 2001) zu einer Reduzierung der entstehenden DNA-Fragmente, während sie bei den anderen Methoden zu einer Verschiebung hin zu kleineren DNA-Fragmenten führt. Aus diesen Gründen eignen sich die Methoden nicht für die Routineanalytik, sondern nur zur Identifizierung von unterschiedlichen DNA-Fragmenten zwischen den Unterarten. Nach deren Identifizierung müssen die Unterschiede in der DNA-Sequenz durch Sequenzierung aus dem Fragment heraus in die Nachbarregionen ermittelt werden. Auf Basis dieser DNA-Sequenz können dann andere Methoden wie die RFLP-Analytik entwickelt werden.

Diese Methode eignet sich gut zur Identifizierung von Unterschieden sehr nahe verwandter Organismen, wie z.B. von Rassen, Varietäten oder Sorten (Becker *et al.*, 1995) oder bei Züchtungen zwischen Filial-Generation und Parental-Generation (Lin *et al.*, 1996) bzw. von gentechnisch veränderten Organismen im Vergleich zu ihrer unveränderten Ausgangslinie (Zagon, 2000). Je weiter sich die zu vergleichenden Organismen voneinander unterscheiden, umso mehr prägen individuelle Punktmutationen die entstehenden AFLP-Muster und eine Identifizierung von gruppenspezifischen Unterschieden wird nicht mehr möglich (Schwonbek *et al.*, 1999). Daher kann die AFLP auch für die Untersuchung der genetischen Diversität von Populationen genutzt werden, was z.B. bei koreanischen Wildschweinen durchgeführt wurde (Kim *et al.*, 2002). Die AFLP verschiedener Schweinerassen mit langen Primern (19 und 22 Bp), die nur wenige Fragmente entstehen lassen, konnte Polymorphismen im Porcine Glucosephosphate Isomerase-Gen betätigen (Jiang und Gibson, 1998), die zuvor über RFLP-Analyse gefunden wurden (Russo *et al.*, 1995). Die Ermittlung von neuen gruppenspezifischen Unterschieden bei einer so heterogenen Gruppe wie die Wildschwein-Populationen, erscheint wenig aussichtsreich und würde den Rahmen einer Doktorarbeit bei weitem sprengen.

3 AUSWAHL MOLEKULARBIOLOGISCHER METHODEN

3.1 DNA-analytische Methoden

3.1.1 GRUNDLEGENDE ANFORDERUNGEN AN EIN PCR-SYSTEM

Die Primer sollen möglichst spezifisch für die nachzuweisende Tierart sein, wenn nicht mehrere Tierarten nebeneinander nachgewiesen werden sollen. Dadurch wird gewährleistet, dass in Mischungen mit anderen Tierarten auch bei geringen Mengenanteilen der gesuchten Art ein Amplifikat gebildet wird. Eine Spezifität in dem Sinne, dass andere Tierarten überhaupt nicht amplifiziert werden, ist bei der Differenzierung von Wild- und Hausschweinen von geringerer Priorität. Wie bereits erwähnt, ist die nächst entfernte Art, die für die Lebensmittelproduktion Relevanz besitzt, bereits in einer anderen Unterordnung angesiedelt. Methoden für die Unterscheidung von z.B. Schweinen und Rindern sind daher bereits ausreichend beschrieben. Zwischen Unterarten hingegen sind kaum so große Sequenzunterschiede zu erwarten, dass die Differenzierung über spezifische Primer (siehe 3.1.3) durchzuführen ist.

Innerhalb des Amplifikats und zwischen den Primern müssen die zur Differenzierung heranzuziehenden Sequenzunterschiede liegen. Das Primer-System muss auf Primer-Dimere, Hairpins und Basenzusammensetzung geprüft werden (Newton und Graham, 1994). Gleiches gilt bei der Betrachtung von Primern und DNA-Sonden bei einem Real-Time-PCR System. Bei Durchführung einer Real-Time-PCR sollte das Amplifikat eine Länge von 90 - 200 Basenpaaren haben. Der untere Wert resultiert aus der Länge der Primer (ca. 2 x 20-25 Bp) und der zwischen den Primern liegenden Sonde, die eine ca. 8-10 °C höhere Schmelztemperatur als die Primer aufweisen soll und damit in der Regel auch länger ist (ca. 25-30 Bp). Bei der FRET-Technologie, wie sie auf dem LightCycler™ angewandt wird, wird eine zweiteilige Sonde, bestehend aus einem Sensor und einem Anker, benötigt, wobei jeder für sich 25-30 Bp aufweist. Zwischen Sensor und Anker sollte ein Abstand von ca. 3 Bp vorhanden sein. Der obere Wert sollte möglichst klein sein, da eine zunehmende Länge der Zielsequenz eine verminderte Nachweisfähigkeit bei stark prozessierten Lebensmitteln bedeutet. Diese Forderung kann aber nur soweit berücksichtigt werden, wie die vorhandenen Sequenzunterschiede in einem DNA-Bereich, die für die Spezifität zuständig sind, das zulassen. In der Regel sind Sequenzunterschiede nicht gleichmäßig über einen DNA-Abschnitt verteilt, sondern variable Bereiche mit größeren Unterschieden wechseln sich mit konservierten Bereichen mit größerer Übereinstimmung ab.

3.1.2 PCR MIT UNIVERSALPRIMERN UND ANSCHLIEßENDER ANALYSE DES AMPLIFIKATS

Durch Kenntnis der DNA-Sequenzen können konservierte Bereiche für die Anlagerung von Primern gewählt werden, die es ermöglichen, bei verschiedenen Tierarten gute PCR-Produkte zu erhalten. Innerhalb dieser Primerbindungsregionen sollten variablere Bereiche liegen, die in ihrer Sequenz zwischen verschiedenen Tierarten größere Unterschiede aufweisen. Die Sequenz zwischen den Primern muss nicht unbedingt bekannt sein. So kann z.B. die aus der Sequenzierung einer cDNA bekannte Sequenz eines gespleißten Gens für die Herstellung von Primern dienen. Ein in der genomischen DNA zwischen den Primerbindungsstellen liegendes Intron kann dann aus den flankierenden Exons heraus sequenziert werden. Die dort vorhandenen Sequenzunterschiede lassen sich durch Sequenzierung oder über eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) identifizieren.

Bei der Durchführung einer PCR mit Primern, die spezifisch an einen bestimmten DNA-Abschnitt des Genoms (Ziel-spezifisch), aber nicht für eine Tierart bzw. Unterart spezifisch binden, so dass auch andere Arten amplifiziert werden, muss die Differenzierung in einem zusätzlichen Analysenschritt erfolgen. Gelingt es nicht, diese Primer-Bindungsregion in einen DNA-Bereich mit großen Sequenzunterschieden zwischen den zu differenzierenden Arten zu legen, kann nur die Aussage getroffen werden, dass die Ziel-DNA vorhanden ist, nicht jedoch, von welchem Taxon. Die Differenzierung kann dann nur in dem Bereich zwischen den Primern erfolgen. Hierbei gibt es neben den im folgenden behandelten Methoden Sequenzierung, RFLP-Analyse, DNA-Sonden, Liganden-Gelelektrophorese und Schmelzkurven noch die Möglichkeit der „Single Strand Conformation Polymorphism“ (SSCP), der „Denaturing Gradient Gel Electrophoresis“ (DGGE) oder der Unterscheidung über unterschiedliche Amplifikatlängen (Moyret *et al.*, 1994).

Ähnlich wie die Liganden-Gelelektrophorese erlaubt die SSCP die Unterscheidung gleich langer DNA-Fragmente, die eine unterschiedliche DNA-Sequenz aufweisen, über gelelektrophoretische Auftrennung. Die zuvor einzelsträngig gemachte DNA geht Selbstbindungen innerhalb des Stranges ein. Abhängig von der Sequenz bindet das 5'-Ende unterschiedlich nahe am 3'-Ende, so dass die Einzelstränge unterschiedliche Konformationen besitzen. Diese laufen dann in einem Polyacrylamidgel (Glavac und Dean, 1993) oder in einem Kapillarpolymer im elektrischen Feld unterschiedlich schnell und können unterschieden werden (Arakawa *et al.*, 1997). SSCP ist in der Routineanwendung von Interesse (Plath *et al.*, 1997; Rehbein *et al.*, 1995), wenn eine Differenzierung nicht über ein oder wenige Enzyme möglich ist (Condie *et al.*, 1993).

Die Unterscheidung über unterschiedlich lange Sequenzabschnitte zwischen gleichen Primerbindungsstellen ist nur bei wenigen DNA-Sequenzen möglich. Wenn zwischen den zu unterscheidenden Tierarten eine größere Anzahl an Deletionen vorhanden ist oder es sich um repetitive Sequenzen handelt, die bei verschiedenen Arten unterschiedlich oft wiederholt werden, werden unterschiedlich lange Amplifikate erzeugt. Eine Differenzierung lässt sich dann in einem höherprozentigen Agarosegel bei langer Laufstrecke schon ab 3-10 Basenpaaren vornehmen (Mülhardt, 1999).

3.1.3 TAXON-SPEZIFISCHE PCR

Bei der Tierart-spezifischen PCR (Taxon-spezifisch) werden Primer verwendet, die nur bei einer Tierart zu einem Amplifikat führen. Hier reicht zur Differenzierung eine PCR ohne Restriktion aus (Meyer R. *et al.*, 1994). Voraussetzung dafür ist, dass die Sequenzunterschiede im Bereich der Primeranlagerung zwischen den zu differenzierenden Arten groß genug sind, um eine Bindung bei der einen zu ermöglichen, während sie bei der anderen ausbleibt. Besonders die Sequenzübereinstimmung am 3'-Ende des Oligonukleotids entscheidet über die Spezifität der Bindung.

3.1.4 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung stellt die Nachweismethode mit der größt möglichen Information dar (Trifonov, 2000). Sequenzunterschiede, die nicht durch Sequenzierung festzustellen sind, können auch nicht über eine andere DNA- oder Protein-Analytik identifiziert werden. Während mit der RFLP-Analyse oder Taxon-spezifischen Primern nur einzelne oder wenige Marker erfasst werden können, können durch die Sequenzierung eine größere Zahl an Markern in einem Reaktionsansatz untersucht werden (Brodmann *et al.*, 2001). So kann der Fehlinterpretation aufgrund von irreführenden Ergebnissen, wie sie z.B. in der RFLP-Analyse beim Ausbleiben eines arttypischen Restriktionsschnitts als Folge von individuellen Punktmutationen entstehen, entgegengewirkt werden. Im Gegensatz zur PCR können auch heterozygote Situationen gut identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenzierung kann jeweils nur ein sehr kleiner Teil des gesamten Genoms analysiert werden. Da die Sequenzierung relativ zeit- und kostenaufwendig ist, kann nur eine Auswahl an Proben zur Identifizierung von Sequenzunterschieden sequenziert werden. Die aufgrund der Sequenzierung erkannten Sequenzunterschiede können mit Hilfe von RFLP-analytischen oder auf DNA-Sonden basierenden Methoden auf ihre Einheitlichkeit bei einer großen Probenanzahl überprüft werden.

3.1.5 RFLP-ANALYSE

Ein in der PCR amplifizierter DNA-Abschnitt kann auf seine Identität durch Restriktionsenzyme getestet werden. Über die spezifische Erkennungssequenz des Enzyms, die überwiegend zwischen 4 und 10 Basenpaare lang ist, kann nachgewiesen werden, dass in dem Amplifikat genau diese Sequenz enthalten ist. Bereits ein Basenaustausch reicht aus, damit das Enzym nicht mehr schneidet, wodurch eine Punktmutationen unterschieden werden kann. Ein erfolgreicher Schnitt (Verdau) eines PCR-Amplifikats kann nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch das Entstehen von zwei gegenüber dem Amplifikat kürzeren Fragmenten identifiziert werden. Bei mehreren Erkennungssequenzen innerhalb des Amplifikats entstehen entsprechend komplexere Schnittmuster. Die RFLP-Analyse ist eine mit wenig Aufwand durchzuführende Untersuchung zur Prüfung von DNA-Sequenzen und zur Unterscheidung von Polymorphismen sowie zur Identifizierung von heterozygoten Situationen (Smouse und Chevillon, 1998; Taberlet *et al.*, 1996). Bei der Verwendung von Universal-Primern zur Amplifikation verschiedener Tierarten wird die Identifizierung über die RFLP vorgenommen (Ram *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 2000).

3.1.6 DNA-SONDEN

Taxon-spezifische DNA-Sonden (Rüggeberg *et al.*, 1997) weisen die gesuchte Tierart durch Hybridisierung mit der Proben-DNA oder mit synthetisierten Oligonukleotiden nach (Meyer G. *et al.*, 1994). Voraussetzung für die Herstellung dieser Sonden ist die Identifikation tierartspezifischer Nukleinsäuresequenzabschnitte durch Sequenz- oder Genom-Analyse (s.o.). An die Sequenzabschnitte werden Markierungsreagenzien gebunden, die einen Nachweis über Farbreaktionen oder Fluoreszenz ermöglichen. Bei einem Dot Blot wird der Nachweis direkt in der extrahierten DNA oder dem PCR-Produkt vorgenommen. Beim Southern Blot erfolgt der Nachweis der PCR-Produkte nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung und anschließender Übertragung der DNA-Fragmente auf eine Membran. Bei der Real-Time-PCR erfolgt die Identifikation durch Fluoreszenzzunahme während der PCR.

3.1.7 LIGANDEN-GELELEKTROPHORESE

Die Durchführung einer Gelelektrophorese unter Zusatz von DNA-retardierenden Stoffen wird als Liganden-Gelelektrophorese bezeichnet und führt zu einer Auftrennung in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung und der Größe des Amplifikats (Meyer G. *et al.*, 1997). Damit soll bei gleich langen Amplifikaten die Unterscheidung von einem Basenaustausch aufgrund unterschiedlicher Laufstrecken im Agarosegel möglich sein (Müller *et al.*, 1997). Die Möglichkeit, Basenunterschiede im Agarosegel nachzuweisen, ist eine

Ergänzung zur RFLP-Analyse oder zur Sequenzierung, um Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen identifizieren zu können.

3.1.8 SCHMELZKURVE DER PCR-AMPLIFIKATE

Der LightCycler™ von Roche ermöglicht die Analyse des PCR-Produktes durch die Aufzeichnung einer Schmelzkurve im Anschluss an die PCR (Roche, 1999). Wird eine Lösung mit dsDNA erhitzt, wird eine Temperatur erreicht, an der die helikale Struktur der DNA verloren geht. Der Punkt, an dem die Hälfte der DNA seine Struktur verloren hat, wird Schmelzpunkt genannt. Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Größe und der Basenzusammensetzung des DNA-Moleküls. Längere Moleküle sowie GC-reiche Moleküle haben einen höheren Schmelzpunkt als kürzere oder AT-reiche Moleküle. Der Schmelzpunkt wird ferner durch die Anordnung der Basen bestimmt und ist nur in Annäherung zu berechnen. Primer-Dimere haben in der Regel einen diffusen Schmelzbereich, der sich klar von dem der spezifischen Amplifikate unterscheidet.

Mit Hilfe von DNA-inkalierenden Fluorophoren wie Sybr® Green I lassen sich jedoch nur Sequenzunterschiede in größerem Umfang nachweisen. Einzelne Punktmutationen können nur durch spezifische DNA-Sonden nachgewiesen werden (Roche, 1998). Dabei wird die Schmelztemperatur zwischen einem Strang des Amplifikats und der DNA-Sonde durch Abnahme der Fluoreszenz bei Ablösung der Sonde bestimmt. Hierbei kann die Schmelztemperatur eines DNA-Fragmentes schon bei einem einzelnen Basenaustausch um einige Grad Celsius differieren.

3.2 Protein-analytische Methoden

Protein-analytische Methoden werden in zahlreichen Varianten zur Identifizierung von Tier- und Pflanzenarten in Lebensmitteln angewendet. Zu den bewährten Verfahren zählt die doppelte Geldiffusion nach Ouchterlony, das Dot blot-Verfahren nach Janssen, die Rocket Immunelektrophorese, Enzym-Immunoassays, SDS Gradient Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie das Immunoblotting (Malmheden Yman *et al.*, 1994; Hofmann, 1997).

Zur Identifizierung von Tierarten in Lebensmitteln sind neben einem Screening-Verfahren auf Basis der Detektion tierartcharakteristischer Fettsäuremuster (s.u.) bisher nur Protein-analytische Methoden in die Methodensammlung nach § 35 LMBG (BgVV, 1997) aufgenommen und somit standardisiert worden. Dazu gehört die isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel (PAGIF) (L-06.00-17, L-06.00-29), die Standard-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) (L-06.00-27), die Doppelte Geldiffusion nach Ouchterlony (L-07.00-35) und die immunoenzymatische Verfahren (ELISA) (L-06.00-47). Diese Protein-analytischen Methoden werden routinemäßig in den Landesuntersuchungsämtern und freien Untersuchungslaboratorien angewendet (Waiblinger *et al.*, 1998), gelangen bei erhitzten Lebensmitteln jedoch an ihre Grenzen (Björklund *et al.*, 2001; Jemmi und Schlosser, 1993; McCormick *et al.*, 1992). Es wurden daher in dieser Arbeit keine konventionellen Protein-analytischen Methoden angewandt.

Zum Nachweis von Unterschieden zwischen Tierarten anhand der gesamten exprimierten Proteine eines Individuums (Proteom) in einem Gewebe eines Tieres werden die extrahierten Proteine gelelektrophoretisch zweidimensional aufgetrennt und auf unterschiedliche Spots hin untersucht. Dabei ist nicht nur das Ausbleiben eines Spots (Protein wird nicht exprimiert) für die Differenzierung relevant, sondern ebenso die relative Stärke eines Spots, der auf einen unterschiedlichen Exprimierungsgrad hinweisen kann. Die Proteine können über die Aminosäuresequenz durch aufwändige Protein-Sequenzierung oder über MALDI-TOF (Kaufmann, 1995; Edvardsson *et al.*, 1999) identifiziert werden. Diese Verfahren sind für die Routine nicht geeignet, können jedoch zur Identifizierung von Genen dienen, bei denen charakteristische Unterschiede auf DNA-Ebene vorhanden sind.

Bisherige Protein-chemische Untersuchungen haben keine reproduzierbaren Unterschiede bei den exprimierten Proteinen zwischen Haus- und Wildschweinen feststellen können (Hofmann, 1989). Die Möglichkeit zur Anwendung einer 2D-Gelelektrophorese in Verbindung mit einer Protein-Identifizierung stand während dieser Doktorarbeit nicht zur Verfügung.

3.3 Vergleich der Analysemethoden

Nicht DNA-analytische Methoden zur Tierartenidentifizierung basieren in erster Linie auf dem Nachweis von Proteinen oder Lipiden. Die dabei zu identifizierenden Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten sind überwiegend auf Unterschiede der DNA-Sequenz zurückzuführen. Endogene Einflüsse können jedoch den Nachweis von Proteinen oder Lipiden oder deren Zuordnung zu einer Gruppe von Tieren erschweren. Endogene Einflüsse auf die DNA beim lebenden Säugetier sind hingegen sehr gering, so wirken sich Mutationen in der Regel nur auf eine oder wenige Zellen aus. Bei der Verarbeitung des Fleisches wird die DNA lediglich degradiert, eine Änderung der charakteristischen Sequenzfolge tritt nicht ein. Über die Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnitts, der wiederum in seiner Sequenz spezifisch für eine bestimmte Tierart ist, kann diese Tierart z.B. in Brühwürsten bereits in Konzentrationen unterhalb von 1 % neben zahlreichen anderen Tierarten nachgewiesen werden (Behrens *et al.*, 1998; Broll *et al.*, 1999). Keine andere Methode ist dazu in der Lage. Darüber hinaus bietet die Analyse der DNA-Sequenz die größt mögliche Auflösung hinsichtlich vorhandener Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen. Zusätzlich zur DNA-Sequenz könnte noch die Methylierung der DNA betrachtet werden, da diese auch für die Aktivierung von Genen verantwortlich ist (Kang *et al.*, 2001; Zuckerkandl, 2002). Ein Vergleich verschiedener Methoden im Hinblick auf die Eignung zur Tierartendifferenzierung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Vergleich der Methoden im Hinblick auf die Eignung zur Tierartenidentifizierung.
Legende: ++ Methode der Wahl; + gut geeignet; – schlecht geeignet; – ungeeignet

	stark prozessierte Proben	Mischungen verschiedener Tierarten	Hohe Auflösung	Unterscheidung nahe verwandter Taxa	Anwendbarkeit in der Routine
DNA					
Sequenzierung	+	-	++	++	-
spezifische PCR	++	++	-	-	++
PCR+RFLP/Sonde	++	+	+	+	+
RAPD	-	-	-	+	-
AFLP	--	-	+	++	--
Proteine					
Immunologisch	-	++	--	+	++
elektrophoretisch	--	-	-	-	+
2D Elekt.+MALDI	--	--	+	++	--
Andere					
HPLC	+	-	+	-	+
GC/MS	+	-	+	-	+
NIR	-	+	-	-	++

IV MATERIAL UND METHODEN

1 MATERIAL

1.1 Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien.

Produktname und Hersteller der verwendeten Chemikalien. Sofern nicht anders aufgeführt hatten die Reagenzien p. A. Qualität.

Produkt	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose LE	Roche, Mannheim
Agarose MS	Roche, Mannheim
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Bisbenzimid H 33258	Hoechst, Frankfurt/Main
Borsäure	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Millipore, Bedford, USA
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck, Darmstadt
Chloroform, ca. 98%ig	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Essigsäure, 100%ig (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol, ca. 98%ig	Merck, Darmstadt
Isopropanol, absolut	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat, Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Phenol, 73%ig in 10 mmol/l Tris-Puffer	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure 25 %ig	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton [®] X-100 (Polyethylenglycol-tert-octylphenylether)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Wasser (bidestilliert)	Fluka AG, Buchs, Schweiz

Tabelle 6: Enzyme.

Produktnamen und Hersteller der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
<i>Taq</i> -Polymerase AmpliTaq Gold™ mit GeneAmp® 10x PCR Puffer und MgCl ₂ -Lösung	Perkin-Elmer, Foster City, USA
<i>Bfa</i> I mit Puffer	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Bsp</i> HI mit Puffer	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Hinf</i> I mit Puffer	Roche, Mannheim
Lysozym (Muramidase)	Merck, Darmstadt
<i>Mae</i> I mit Puffer	Roche, Mannheim
<i>Mvn</i> I mit Puffer	Roche, Mannheim
Proteinase K 20 mg/ml	Merck, Darmstadt
<i>Tsp</i> 509I mit Puffer	New England Biolabs, Beverly, USA
Uracil-DNA-Glycosylase, heat labile	Roche, Mannheim

Tabelle 7: Fertigreagenzien.

Produktnamen und Hersteller der verwendeten Reagenzien.

Reagenzienname	Hersteller
310 Genetic Analyzer Buffer 10x mit EDTA	Perkin-Elmer, Foster City, USA
Bisbenzimid-PEG (H.A.-Yellow)	GeneScan Analytics, Freiburg
Calf Thymus DNA	Sigma, St. Louis, USA
dATP-Lösung, 10 mmol/l	Perkin-Elmer, Foster City, USA
dCTP-Lösung, 10 mmol/l	Perkin-Elmer, Foster City, USA
dGTP-Lösung, 10 mmol/l	Perkin-Elmer, Foster City, USA
DNA-Ladder 10 bp, 50 bp, 100 bp, 1µg/µl	GIBCO BRL, Paisley, United Kingdom
DNA-Längenstandard VIII und IX, 250 ng/µl	Roche, Mannheim
dTTP-Lösung, 10 mmol/l	Perkin-Elmer, Foster City, USA
dUTP-Lösung, 20 mmol/l	Perkin-Elmer, Foster City, USA
Ethidiumbromid-Lösung, 1%ig in Wasser	Merck, Darmstadt
Gene Amp 10x PCR Puffer	Perkin-Elmer, Foster City, USA
Guanidin-Hydrochlorid-Lösung, 8 mol/l in Wasser	Fluka AG, Buchs, Schweiz
LightCycler™ - FastStart DNA Master Hybridization Probes (enthält: 10 mmol/l MgCl ₂ , 100 mmol/l dNTPs, <i>Taq</i> -Polymerase, 10x Puffer)	Roche, Mannheim
LightCycler™ - FastStart DNA Master Sybr® Green I (enthält: Sybr® Green, 10 mmol/l MgCl ₂ , 100 mmol/l dNTPs, <i>Taq</i> -Polymerase, 10x Puffer)	Roche, Mannheim
Magnesiumchloridlösung, 25 mmol/l	Perkin-Elmer, Foster City, USA
MicroSpin™ S-400 HR Säulen	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Performance Optimized Polymer 6	Perkin-Elmer, Foster City, USA
10-Phenyl-Neutralrot-PEG (H.A.-Red)	Hanse-Analytik, Bremen
Sequencing-Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (enthält: dNTPs, ddNTPs, Puffer, MgCl ₂ , <i>Taq</i> -FS-Polymerase)	Applied Biosystems, Foster City, USA

Tabelle 8: Reagenzien-Rezepturen.

Name und Zusammensetzung der selbst hergestellten Reagenzien-Mischungen nach Sambrook *et al.* (1989).

Reagenzienname	Zusammensetzung
Ammoniumacetat-Lösung (10 mol/l)	385 g Ammoniumacetat (77,08 g/mol) in ca. 350 ml Wasser gelöst ad 500 ml sterilfiltriert
Bisbenzimid-Stammlösung (1 mg/ml)	10 mg Bisbenzimid ad 10 ml
Bisbenzimid-Lösung (100 ng/ml)	10 ml TNE-Puffer (10x) 10 µl Bisbenzimid-Stammlösung (1 mg/ml) (Messwert: 10-500 ng/µl) ad 100 ml
CTAB-Extraktionslösung (55 mmol/l)	20 g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, 364.46 g/mol) 81,82 g Natriumchlorid (58,44 g/mol) 100 ml Tris-Cl-Lösung (1 mol/l) 40 ml EDTA-Puffer (0,5 mol/l) pH 8,0 mit Salzsäure eingestellt ad 1000 ml über Nacht bei RT stehen gelassen sterilfiltriert + autoklaviert
Dichlormethan/Isoamylalkohol- Mischung 24:1	920 ml Dichlormethan 40 ml Isoamylalkohol
dNTP-Mischung	100 µl dATP (10 mmol/l) 100 µl dCTP (10 mmol/l) 100 µl dGTP (10 mmol/l) 100 µl dTTP (10 mmol/l)
dNTP-Mischung mit Uracil	100 µl dATP (10 mmol/l) 100 µl dCTP (10 mmol/l) 100 µl dGTP (10 mmol/l) 100 µl dUTP (20 mmol/l)
EDTA-Puffer (0,5 mol/l)	93,05 g Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure Dihydrat (EDTA; 372,2 g/mol) in ca. 400 ml gelöst pH 8,0 mit Natriumhydroxid eingestellt ad 500 ml sterilfiltriert, aliquotiert und autoklaviert
Ethanol (70 Vol%)	70 ml absoluter Ethanol 30 ml Wasser
Gel-Lade-Puffer Ia	3,75 mg Bromphenolblau 600 mg Saccharose in 1,5 ml gelöst
Gel-Lade-Puffer Ib	3,75 mg Xylencyanol 600 mg Saccharose in 1,5 ml gelöst
Isopropanol (80 Vol%)	80 ml absoluter Isopropanol 20 ml Wasser
Kalbsthymus-DNA-Lösung (1 mg/ml)	250 µg Calf Thymus DNA (Sigma D-0805; 5 U) in 250 µl TE Puffer gelöst

Reagenzienname	Zusammensetzung
Kalbsthymus-DNA-Lösung (100 µg/ml)	50 µl Kalbsthymus-DNA-Lösung (1 mg/ml) 50 µl TNE-Puffer (10 x) ad 500 µl
Kaliumacetat- Neutralisationspuffer (3 mol/l)	29,44 g Kaliumacetat (98,14 g/mol) ad 100 ml pH 5,5 mit Salzsäure eingestellt
Lysozym-Lösung (10 mg/ml)	100 mg Lysozym in 10 ml gelöst zu 100 µl aliquotiert
Natriumacetat-Lösung (3 mol/l)	40,81 g Natriumacetat Trihydrat (136 g/mol) in 80 ml gelöst pH 4,6-5,2 mit Essigsäure eingestellt ad 100 ml sterilfiltriert und autoklaviert
Natriumchlorid-Lösung (gesättigt)	ca. 200 g Natriumchlorid (58,44 g/mol) in 500 ml mit Bodensatz lösen
PIC-Lösung	25 Vol Phenol 24 Vol Chloroform 1 Vol Isoamylalkohol
SDS-Stammlösung (25 %)	250 g Natriumdodecylsulfat (SDS; 288,4 g/mol) in ca. 900 ml Wasser gelöst auf 68 °C erwärmt mit Salzsäure auf pH 7,2 eingestellt ad 1000 ml sterilfiltriert und aliquotiert
SDS-Lyse-Puffer (1 %)	0,8 g Natriumhydroxid (40,00 g/mol) 4 ml SDS-Stammlösung (25 %) ad 100 ml
TBE-Stammlösung (5x)	54 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (121,1 g/mol) 27,5 g Borsäure (61,83 g/mol) 20 ml EDTA-Puffer (0,5 mol/l) ad 1000 ml
TBE-Puffer (0,5x)	100 ml TBE-Stammlösung (5x) ad 1000 ml
TE-Puffer (1x)	5 ml Tris-Cl-Lösung (1 mol/l) 1 ml EDTA-Puffer (0,5 mol/l) ad 500 ml pH 8,0 mit Salzsäure eingestellt sterilfiltriert und autoklaviert
TEN-Extraktionslösung (2 x)	10 ml Tris-Cl-Lösung (1 mol/l) 20 ml EDTA-Puffer (0,5 mol/l) 2,922 g Natriumchlorid (58,44 g/mol) in ca. 450 ml gelöst pH 8,0 mit Salzsäure eingestellt ad 500 ml

Reagenzienname	Zusammensetzung
TNE-Puffer (10x)	12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (121,1 g/mol) 20 ml EDTA-Puffer (0,5 mol/l) 116,89 g Natriumchlorid (58,44 g/mol) in ca. 800 ml gelöst pH 7,4 mit Salzsäure eingestellt ad 1000 ml sterilfiltriert (0,45 µm), aliquotiert und autoklaviert
Tris-Cl-Lösung (1 mol/l)	12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (121,1 g/mol) in ca. 80 ml gelöst pH 8,0 mit Salzsäure eingestellt ad 100 ml sterilfiltriert (0,22 µm), aliquotiert und autoklaviert
Tris/SDS-Extraktionslösung	10 ml Tris-Cl-Lösung (1 mol/l) pH 8,0 mit Salzsäure eingestellt 0,876 g Natriumchlorid (58,44 g/mol) 2 ml EDTA-Puffer (0,5 mol/l) 1 g SDS ad 100 ml
Triton X-100-Puffer (1 %)	20 ml Tris-Cl-Lösung (1 mol/l) 3,728 g Kaliumchlorid (74,55 g/mol) 4 ml EDTA (0,5 mol/l) 10 ml Triton® X-100 (besteht aus Polyoxyethylenether und anderen oberflächenaktiven Komponenten) pH 8,0 mit Salzsäure eingestellt ad 1000 ml

Falls nicht anders angegeben, handelt es sich um wässrige Lösungen, die entweder steril filtriert und / oder autoklaviert wurden. Das verwendete Wasser war bidestilliert oder vergleichbarer Qualität, die verwendeten Chemikalien hatten eine p.A. Qualität, sofern nicht anders angegeben.

1.2 Primer und Sonden

Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin lyophilisiert geliefert und in bidestilliertem und autoklaviertem Wasser gelöst. Primer wurden auf eine Konzentration von 20 µmol/l, Sonden auf 4 µmol/l eingestellt.

Tabelle 9: Primer, die der Literatur entnommen wurden.

(*Sequenz der Primer entspricht dem Strang s = sense bzw. a = anti-sense des Gens, T_A = Primer-Anlagerungstemperatur).

Primer	S*	korresp. Primer	Amplifikat (Bp)	Oligonukleotidsequenz 5'-3'	T _A (°C)
Cytb 1f-UP	s	Cytb2r-UP	359	CCA TCC AAC ATC TCA gCA TgA TgA AA	55
Cytb 2r-UP	a	Cytb1f-UP	359	gC CCC TCA gAA TgA TAT TTg TCC TCA	55
Cytb 2f-UP	s	Cytb3r-SW	221	TgA ggA CAA ATA TCA TTC TgA ggA gC	55
TR03	s	TR04	137	TCT gCC CTA TCA ACT TTC gAT ggT A	72
TR04	a	TR03	137	AAT TTg CgC gCC TgC TgC CTT CCT T	78
41f	s	1066r	1025	gCT CAg ATT gAA CgC Tgg Cg	53
1066r	a	41f	1025	ACA TTT CAC AAC ACg AgC Tg	53

Tabelle 10: Primer, die während dieser Arbeit entwickelt wurden.

(*Sequenz der Primer entspricht dem Strang s = sense a = anti-sense des Gens, T_A = Primer-Anlagerungstemperatur).

Primer	S*	korresp. Primer	Amplifikat (Bp)	Oligonukleotidsequenz 5'-3'	T _A (°C)
Cytb 1f-WO	s	Cytb 2r-WO	359	CCA TCI AAC ATY TCA KCA TgA TgA AA	55
Cytb 2r-WO	a	Cytb 1f-WO	359	GcY CCT CAg AAT gAT ATT TgK CCT CA	55
Cytb 1f-SW	s	Cytb 2r-SW	359	CCC TCA AAC ATC TCA TCA TgA TgA AA	55
Cytb 2r-SW	a	Cytb 1f-SW	359	GCT CCT CAg AAT gAT ATT TgT CCT CA	55
Cytb 3r-SW	a	Cytb 2f-UP	221	ggg TTg TTg gAT CCg gTT TCg Tg	55
Cytb 3f-SW	s	Cytb 4r-SW	173	CAC gAA ACC ggA TCC AAC AAC CC	55
Cytb 4r-SW	a	Cytb 3f-SW	173	ggg gTg TAg TTg TCT ggg TCT CC	55
Cytb 4f-SW	s	Cytb 5r-SW	282	ggA gAC CCA gAC AAC TAC ACC CC	55
Cytb 5r-SW	a	Cytb 4f-SW	282	TTC TAC ggg TTg TCC TCC AAT TCA	55
DL 1f	s	DL 3r	665	gCT gAA ATT CTA ACT AAA CTA TTC	55
DL 2f	s	DL 5r	606	ATC gCC CAC TCT TTC CCC TTA	65
DL 4f	s	DL 6r	343	CAA ACC CCC CTT ACC CCC	60
DL 3r	a	DL 1f	665	TCC ATg AAg TCC AgC TAC AAT	55
DL 5r	a	DL 2f	606	TgT TTT Tgg ggT TTg gCA Agg	65
DL 6r	a	DL 4f	343	TAg gCA TTT TCA gTg CCT TgC	60
MC1f-SW	s	MC 3r-SW	235	CAC TCg CCC ATg TAC TAC TTC gTC	60
MC2f-SW	s	MC 5r-SW	276	ATg TCA Tgg ACg TgC TCA TCT gCg	60
MC3r-SW	a	MC 1f-SW	235	TAg AAg ATg gAC ACg TAg Cgg TCC AC	60
MC4f-SW	s	MC 6r-SW	334	TTC ATC gCC TAC TAC CAC CAC AC	60
MC5r-SW	a	MC 2f-SW	276	ATg Tgg ACg TAC AgT ACC gCC ATg	60
MC6r-SW	a	MC 4f-SW	334	TTg CAg ATg ACg Agg gCC AgA AAg	60

☞ Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Primer	S*	korresp. Primer	Amplifikat (Bp)	Oligonukleotidsequenz 5'-3'										T _A (°C)
D-Sus f1	s	D-Sus r1/r2	160/175	ATA	ACT	CCA	gTC	AAC	ATg	CA				50
D-Sus f2	s	D-Sus r1/r2	267/282	CgT	CgT	gCA	TTA	ATT	gCT	Ag				53
D-Sus r1	a	D-Sus f1/f2	160/267	ACC	CCC	ACg	gTT	TAT	g					52
D-Sus r2	a	D-Sus f1/f2	175/282	TCA	TCA	ATA	gAA	ACC	CCC	A				51
Ra 1	-	-	diverse	AgC	Agg	TCA	AT							20-30
Ra 2	-	-	diverse	AgC	Agg	TCT	A							20-30
Ra 3	-	-	diverse	AgC	Agg	TTC	A							20-30
Ra 4	-	-	diverse	ACT	gTg	TCA	ATC							20-30
Tyr 1f	s	Tyr 3r	405	TgA	Agg	ggT	AgC	Tgg	AAA	gA				58
Tyr 3r	a	Tyr 1f	405	ggT	CCC	TgA	AAg	CCA	AAC	T				58
Tyr 2f	s	Tyr 4r	388	CTT	ggC	CCT	CCg	TCT	TTT	AT				58
Tyr 4r	a	Tyr 2f	388	CAG	gAA	ACC	Tgg	TgC	TTC	AT				58
Imu 1f	s	Imu 3r	628	TCC	TgT	TCC	TgC	TTT	TgC					54
Imu 3r	a	Imu 1f	628	gAg	AAT	ggT	gAg	ATg	AAg	TTC				56
Imu 2f	s	Imu 5r	584	CCC	ATC	CCC	AAA	TCg	gAg					58
Imu 5r	a	Imu 2f	584	Agg	AgT	TCC	CCC	AAg	CAC	Cg				63
Imu 4f	s	Imu 6r	693	CCT	gAA	gAg	ggT	Tgg	TgT	C				59
Imu 6r	a	Imu 4f	693	CAC	AgA	ggC	AgT	ATT	ACA	AAT	g			56
MS602 f	s	MS602 r	564	TCT	TTT	gTg	AAT	gCT	ggg					51
MS602 r	a	MS602 f	564	TAg	AgA	AAC	CAT	AAC	CTg	gAg				56

Tabelle 11: DNA-Sonden, die für die Real-Time-PCR entwickelt wurden.

(*Lage der Sonden in der D-Loop-Region; +X = Fluoreszein p = LC-Red 640).

Sonde	Lage*	Oligonukleotidsequenz ⁺ 5'-3'												T _A (°C)	
CC	207-233	CAC	CAC	TAg	ATC	ACg	AgC	TTA	ACT	ACC	X				59,4
CT	207-233	CAC	CAC	TAg	ATC	ACg	AgC	TTA	ATT	ACC	X				59,0
TC	207-233	CAC	CAT	TAg	ATC	ACg	AgC	TTA	ACT	ACC	X				59,0
TT	207-233	CAC	CAT	TAg	ATC	ACg	AgC	TTA	ATT	ACC	X				58,5
TC-lang	202-235	ATC	ACC	ACC	ATT	AgA	TCA	CgA	gCT	TAA	CTA	CCA	T	X	66,1
Anker	237-260	CCg	CgT	gAA	ACC	AgC	AAC	CCg	CTT	p					74,3

1.3 Proben

Tabelle 12: Referenz- und Matrixproben von Haus- und Wildschweinen sowie von anderen Tierarten.

Die Proben wurden zur Verfügung gestellt vom Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Frankfurt/Oder, von der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach, dem Chemisches Landesuntersuchungsamt Münster, dem Landesuntersuchungsamt Südbayern sowie der Tierzuchtforschung e.V. München - Institut für Blutgruppenforschung und Immunbiologie oder käuflich erworben.

Probe	Genus/Species/Ssp.	G. Geographische Herkunft
1 Hausschwein	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
2 Pute	<i>Meleagris gallopava</i>	- -
3 Rind	<i>Bos taurus domestica</i>	- -
4 Huhn	<i>Gallus gallus</i>	- -
5 Hausschwein	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
6 Wildschwein 1	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Haakow 1995
7 Wildschwein 2	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Groß Döbbern 1995
8 Wildschwein 3	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Groß Dalgow 1995
9 Wildschwein 4	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Klein Döbbern 1995
10 Wildschwein 5	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Oßmig 1995
11 Wildschwein 6	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB 1995
12 Wildschwein 7	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Schwarzheide 1995
13 Wildschwein 8	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Brakendorf 1995
14 Wildschwein 9	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Frankfurt 1995
15 Wildschwein 10	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Frankfurt 1995
16 Wildschwein 11	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Frankfurt 1995
17 Wildschwein 12	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Frankfurt 1995
18 Wildschwein 13	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Koselendorf 1995
19 Wildschwein 14	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Biberdorf 1995
20 Wildschwein 15	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB 1995
21 Wildschwein 16	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Butzen 1995
22 Wildschwein 17	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB 1995
23 Wildschwein 18	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Drachhausen 1995
24 Wildschwein 19	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Drachhausen 1995
25 Wildschwein 20	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Neu Golm 1995
26 Wildschwein 21	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Vierraden/Schwedt 1997
27 Wildschwein 22	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Kunow/Welsetal 1997
28 Wildschwein 23	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Groß Pinnow 1997
29 Wildschwein 24	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- BB-Kunow/Welsetal 1997
30 Wildschwein männl.	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m -
31 Wildschwein weibl.	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w -
32 Wildschwein	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- -
33 Wildschwein	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- -
34 Wildschwein	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- Australien
35 Wildschwein 181094-2	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
36 Wildschwein 181094-5	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
37 Wildschwein 181094-12	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
38 Wildschwein 181094-15	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
39 Wildschwein 181094-18	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
40 Wildschwein 181094-31	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
41 Wildschwein 181094-34	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
42 Wildschwein 181094-35	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
43 Wildschwein 100195-1	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
44 Wildschwein 100195-6	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
45 Wildschwein 190195-1	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Rohrbrunn, Spessart
46 Wildschwein 190195-5	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
47 Wildschwein 031195-1	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Rohrbrunn, Spessart

↪ Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

MATERIAL UND METHODEN
GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Probe	Genus/Species/Ssp.	G. Geographische Herkunft
48 Wildschwein 031195-2	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
49 Wildschwein 031195-3	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
50 Wildschwein 031195-5	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
51 Wildschwein 031195-7	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Rohrbrunn, Spessart
52 Wildschwein 031195-8	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
53 Wildschwein 031195-9	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Rohrbrunn, Spessart
54 Wildschwein 031195-10	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
55 Wildschwein 031195-11	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
56 Wildschwein 031195-13	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Rohrbrunn, Spessart
57 Wildschwein 051295-1	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
58 Wildschwein 051295-3	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
59 Wildschwein 051295-4	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
60 Wildschwein 051295-5	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
61 Wildschwein 051295-9	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
62 Wildschwein 051295-11	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
63 Wildschwein 051295-12	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
64 Wildschwein 051295-13	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
65 Wildschwein 051295-15	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
66 Wildschwein 051295-17	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
67 Wildschwein 051295-18	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
68 Wildschwein 051295-20	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
69 Wildschwein 051295-21	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
70 Wildschwein 051295-22	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
71 Wildschwein 051295-23	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
72 Wildschwein 051295-25	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
73 Wildschwein 051295-26	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
74 Wildschwein 051295-30	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
75 Wildschwein 061295-38	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
76 Wildschwein 061295-45	<i>Sus scrofa scrofa</i>	w Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
77 Wildschwein 061295-46	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
78 Wildschwein 061295-52	<i>Sus scrofa scrofa</i>	m Wittelsbach/Kösching/Ingolstadt
79 Wildschwein ungegart	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- Jena
80 Wildschwein gegart	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- Jena
81 Hausschwein	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- -
82 Wildschwein 1	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- -
83 Wildschwein 2	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- -
84 Deutsche Landrasse 1	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
85 Deutsche Landrasse 2	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
86 Deutsche Landrasse 3	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
87 Deutsche Landrasse 4	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
88 Deutsche Landrasse 5	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
89 Deutsche Landrasse 6	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
90 Deutsche Landrasse 7	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
91 Deutsche Landrasse 8	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
92 Deutsche Landrasse 9	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
93 Deutsche Landrasse 10	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
94 Piétrain 1	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
95 Piétrain 2	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
96 Piétrain 3	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
97 Piétrain 4	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
98 Piétrain 5	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
99 Piétrain 6	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
100 Piétrain 7	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
101 Piétrain 8	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
102 Piétrain 9	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
103 Piétrain 10	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Bayern, Blutprobe
104 Hausschwein	<i>Sus scrofa f. domestica</i>	- Schleswig-Holstein
105 Brühwurst 1	HS/R/H/P/S	- -

↪ Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

MATERIAL UND METHODEN
GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Probe	Genus/Species/Ssp.	G. Geographische Herkunft
106 Brühwurst 2	<i>HS/P</i>	- -
107 Brühwurst 3	<i>HS/Huhn</i>	- -
108 Brühwurst 4	<i>HS/R</i>	- -
109 Brühwurst 5	<i>HS/Schaf</i>	- -
110 Brühwurst 6	<i>HS</i>	- -
111 Brühwurst 7	<i>R</i>	- -
112 Brühwurst 8	<i>P</i>	- -
113 Brühwurst 9	<i>Huhn</i>	- -
114 Brühwurst 10	<i>HS/R/H/P</i>	- -
115 Wildschwein	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- Schleswig-Holstein
116 Antilope	<i>Antilope cervicapra</i>	- Südafrika
117 Hirsch	<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>	- -
118 Kaninchen	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	- -
119 Hirsch	<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>	- -
120 Wildschwein	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- Schleswig-Holstein
121 Wildschwein	<i>Sus scrofa scrofa</i>	- Schleswig-Holstein
122 Gans	<i>Anser anser</i>	- -
123 Lamm	<i>Ovis ovis</i>	- -
124 Hausschwein-Salami	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
125 Hausschwein-Leberwurst	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
126 Hausschwein- Lachsschinken	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
127 Huhn roh	<i>Gallus gallus</i>	- -
128 Deutsche Landrasse 11	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
129 Deutsche Landrasse 12	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
130 Deutsche Landrasse 13	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
131 Deutsche Landrasse 14	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
132 Deutsche Landrasse 15	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
133 Deutsche Landrasse 16	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
134 Deutsche Landrasse 17	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
135 Deutsche Landrasse 18	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
136 Deutsche Landrasse 19	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
137 Deutsche Landrasse 20	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
138 Piétrain 11	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
139 Piétrain 12	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
140 Piétrain 13	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
141 Piétrain 14	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
142 Piétrain 15	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
143 Piétrain 16	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
144 Piétrain 17	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
145 Piétrain 18	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
146 Piétrain 19	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
147 Piétrain 20	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- Bayern, Blutprobe
148 Hängebauchschwein	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
149 Bentheim	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
150 Schwäbisch Hällsches	<i>Sus scrofa</i> f. domestica	- -
151 Brühwurst 11	diverse	- -
152 Brühwurst 12	diverse	- -
153 Brühwurst 13	diverse	- -
154 Brühwurst 14	diverse	- -
155 Brühwurst 15	diverse	- -
156 Vollkonserve 1	diverse	- -
157 Vollkonserve 2	diverse	- -
158 Vollkonserve 3	diverse	- -
159 Vollkonserve 4	diverse	- -
160 Vollkonserve 5	diverse	- -
161 Vollkonserve 6	diverse	- -
162 Vollkonserve 7	diverse	- -
163 Vollkonserve 8	diverse	- -
164 Vollkonserve 9	diverse	- -

1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Geräte.

Produktname und Hersteller der verwendeten Geräte.

Gerät, Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav Varioklav 500 EV-Z	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Digitalkamera	biostep, Jahnsdorf
Power-Supply EPS 3500 XL	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fluorometer Hoefer Dyna Quant™ 200	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Gekühlte Tischzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kapillarelektrophorese-Kapillare (50 µm i.D., 44 und 60 cm Länge)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Kreisschüttler Phero-Shaker 13A34	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Mikroliterzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Minishaker MS1	IKA-Works Inc., Wilmington, USA
Mixer GT 800	Rotor AG, Uetendorf, Schweiz
pH-Meter CG 837	Schott, Hofheim a.T.
Präzisionswaage PM 2000	Mettler Toledo, Columbus, USA
Real-Time-PCR-System LightCycler™	Roche, Mannheim
Schüttelwasserbad GLS400	Grant Instruments Ltd., Cambridge
Sequenzierer 310 Genetic Analyzer ABI Prism™	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermocycler Gene Amp 2400	Perkin-Elmer, Foster City, USA
Thermocycler Mastercyclergradient	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode
Ultra-Turrax T25	IKA-Works Inc., Wilmington, USA
Vakuum-Konzentrator Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 14: Verbrauchsmaterial.

Produktamen und Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Filtertips 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
ART® Filtertips 20 µl, 200 µl	Molecular Bio-Products, Inc., San Diego, USA
GENERATION Capture Disk Kit	Gentra Systems, Inc., Minneapolis
LightCycler™-Capillaries	Roche, Mannheim
Multi Ultra Tubes® 0,2 ml	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp	Perkin-Elmer, Foster City, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega, Madison, USA
Microspin™ S-400 HR Columns	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

2 METHODEN

2.1 DNA-Präparation

Die DNA-Präparation dient zur Abtrennung der DNA von den übrigen Bestandteilen des Lebensmittels. Dazu müssen die Zellen zerstört werden und die Matrix, insbesondere die PCR-inhibierend wirkenden Stoffe (De Boer *et al.*, 1995; Rossen *et al.*, 1992) von der DNA getrennt werden. Bei hoch prozessierten Lebensmitteln mit niedrigem DNA-Gehalt dient sie auch zur Anreicherung des DNA-Gehaltes in der Probe (Hellebrand *et al.*, 1998). Für verschiedene Lebensmittel oder Gewebe ist die Anwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden zum Erreichen einer optimalen Ausbeute an Nukleinsäuren notwendig (Pauli *et al.*, 2000). Verschiedene Extraktionsmethoden wurden für rohes und prozessiertes Fleisch getestet und adaptiert.

2.1.1 GUANIDIN-HYDROCHLORID-METHODE

Nach der Methode von Meyer R. *et al.* (1995) wurden 300 mg der Probe eingewogen und mit 430 µl Tris/SDS-Extraktionslösung gemischt. Zur Lyse wurden 50 µl 5 mol/l Guanidin-Hydrochlorid-Lösung und 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und über Nacht bei 37 °C auf einem Thermomixer unter Schütteln oder bei 57 °C für 3 h inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 14500 g für 10 min wurde der Überstand (ca. 450 µl) abpipettiert.

2.1.2 CTAB-METHODE

Angelehnt an die DNA-Extraktionsmethode L-24.01-1 der Methodensammlung nach § 35 LMBG (BgVV, 1997) für den Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Kartoffeln wurden 100 mg der Probe in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Zur Lyse wurden 500 µl CTAB-Extraktionslösung und 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 65 °C für 90 min unter Schütteln. Nach dem Zentrifugieren bei 14500 g für 10 min wurden 250 µl des Überstandes abgenommen und mit 200 µl Dichlormethan/Isoamylalkohol-Mischung versetzt. Der Ansatz wurde im Minishaker gemischt, und bei 21000 g für 15 min zentrifugiert. 300 µl der wässrigen Phase wurden abpipettiert und zur Fällung der Nukleinsäuren mit 300 µl Isopropanol versetzt. Nach dem Mischen wurde der Ansatz bei RT für 20 min stehen gelassen und anschließend bei 21000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat (Pellet) mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 21000 g für 5 min wurde der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Pellet wurde für 3 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 100 µl autoklaviertem Wasser gelöst.

2.1.3 PHENOL-EXTRAKTION

Entsprechend der Methode L-08.00-44 der Methodensammlung nach § 35 LMBG - (BgVV, 1997) zum Nachweis einer gentechnischen Veränderung von *Lactobacillus curvatus* in Rohwurst wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß 400 mg der Probe in 1,2 ml autoklaviertem Wasser suspendiert. Der Ansatz wurde 10 min stehen gelassen. 500 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Zur Lyse wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl 2x TEN/Saccharose-Extraktionslösung suspendiert. 50 µl Lysozym-Lösung wurden zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl SDS-Lösung (25%ig) und 25 µl Proteinase K-Lösung wurde die Mischung für 10 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurde 1 Volumenteil einer 1:1 Mischung aus Phenol und der Dichlormethan-Isoamylalkohol-Mischung zugegeben, 2 min lang gemischt und 3 min bei 12000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 Volumenteil Chloroform zugegeben und 2 min gemischt. Die Mischung wurde 3 min bei etwa 12000 g zentrifugiert und die obere Phase in ein neues 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in das 0,1 Volumenteile Natriumacetat-Lösung und 1 Volumenteil Isopropanol vorgelegt wurden. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 min bei RT wurde für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl Ethanol gewaschen. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei etwa 12000 g wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 2-5 min bei RT getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 100 µl Wasser aufgenommen.

2.1.4 NATRIUMCHLORID-METHODE

Nach der Methode von Wink und Wehrle (1994) wurde die Probe in 5 ml 2x TEN-Extraktionslösung gegeben, kräftig geschüttelt und 50 µl Proteinase K-Lösung und 240 µl 25%ige SDS-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass eine homogene Flüssigkeit entstanden ist. 3 ml einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung wurden hinzugefügt, geschüttelt und die ausgefallenen Proteine bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 2 Vol. absolutem Ethanol versetzt und anschließend bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4000 g wurden die Nukleinsäuren in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 1 ml TE-Puffer (1x) mit pH 7,4 aufgenommen.

2.1.5 QIAGEN-METHODE ZUR DNA-EXTRAKTION AUS BLUT

Nach der Methode der Firma QIAGEN GmbH, Hilden (QIAGEN, 1999) zur DNA-Extraktion aus Blut mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit. 20 µl wurden Proteinase K in ein

1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. 200 µl der gut gemischten Blutprobe, die ca. 3-12 µg DNA enthalten, wurden zugegeben. Nach Zugabe von 200 µl Puffer AL wurde der Ansatz für 15 s im Minishaker gemischt, so dass eine homogene Lösung entstand und bei 56 °C für 10 min inkubiert. 200 µl absoluter Ethanol wurden zu dem Ansatz gegeben, 15 s im Minishaker gemischt. Die Lösung wurde dann in eine QIAamp Spin Säule, die in einem 2 ml Reaktionsgefäß stand, eingefüllt und 1 min bei 6000 g und RT zentrifugiert. Falls die Lösung nicht vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde erneut bei höherer Drehzahl zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. 500 µl Puffer AW1 wurden hinzugegeben und für 1 min bei 6000 g und RT zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, 500 µl Puffer AW2 auf die Säule gegeben und 3 min bei 20000 g und RT zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt und 200 µl destilliertes Wasser hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Säule für 1 min bei 6000 g und RT zur Elution der gereinigten Nukleinsäuren zentrifugiert.

2.1.6 METHODE NACH BURGNER UND HÜBNER

Bei der Methode nach Burgner und Hübner (1998) zur Anreicherung mitochondrialer DNA wurden 500 mg der Probe in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß eingewogen. 700 µl Triton X-100-Puffer (pH 8,0) wurden zugegeben und 30 s im Minishaker gemischt, dann für 10 min bei RT inkubiert. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei 10000 g wurden 300 µl Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 300 µl 1%ige SDS-Lyse-Puffer wurden zugegeben und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. 300 µl 3 mol/l Kaliumacetat-Neutralisationspuffer wurden zugegeben und erneut für 20 min auf Eis inkubiert. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 15000 g wurde der Überstand in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Nukleinsäure-Fällung wurde ein Volumenanteil absoluter Isopropanol hinzugegeben und 20 min bei -20 °C inkubiert. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 15000 g wurde der Überstand verworfen und 500 µl 70%iger Ethanol zugegeben. Abschließend wurde 10 min bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 50 µl autoklaviertem Wasser gelöst.

2.1.7 REINIGUNG

Die DNA musste von sämtlichen Substanzen befreit werden, die eine PCR stören, d.h. in erster Linie die Polymerase inhibiert hätten. Dazu gehörten ionische Detergentien, die die *Taq*-Polymerase in Konzentrationen über 0,01 % gehemmt hätten, und der zum Waschen verwendete Alkohol. Weiterhin mussten Proteasen entfernt oder inaktiviert werden.

Bei der Säulenextraktion wurde die DNA an eine Silicagel-Membran bei einem pH-Wert von $\leq 7,5$ adsorbiert, wobei das Optimum bei pH 5,0 lag. Nach dem Waschen wurde die DNA bei pH 8,5 eluiert. Alternativ zur Säulenextraktion wurde die DNA-Fällung angewandt.

Handelte es sich um chromosomale DNA bzw. um lange Ketten > 5000 Bp, musste sie nach der Aufarbeitung vorsichtig behandelt werden, um eine Degradation zu vermeiden.

a) QIAGEN-Säulen

Entsprechend der Anleitung der Firma QIAGEN GmbH, Hilden (QIAGEN, 1998) wurde die Reinigung der extrahierten DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit vorgenommen. Zu 100 μ l Probe wurden 500 μ l Adsorptionspuffer PB auf eine QIAquick Spin Säule gegeben und mit 750 μ l Waschpuffer PE gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 μ l Elutionspuffer EB.

b) Wizard[®]-Säulen

Entsprechend der Anleitung des Wizard[®] Genomic DNA Purification Kits der Firma Promega (Promega, 1998) wurden 450 μ l des Nukleinsäure-Extraktes mit 1 ml des Wizard[®] Purification Resin gemischt und auf eine Säule gegeben. Die Säule wurde mit 2 ml 80%iges Isopropanol gewaschen und mit 50 μ l 1x TE-Puffer wurde die DNA eluiert.

c) DNA-Fällung

Die DNA-Fällung erfolgte mit Ethanol oder Isopropanol in Gegenwart eines einwertigen Kations (siehe Tabelle 15). Das kaotrophe Ion entfernte die Hydrathülle der DNA. Natriumacetat wurde für die meisten Routinefällungen verwendet. Eine Ammoniumacetat-Lösung wurde alternativ verwendet, um die Kopräzipitation von kurzen Oligonukleotiden zu reduzieren, es musste jedoch in höheren Konzentrationen eingesetzt werden (2,5 mol/l Endkonzentration). Teilweise erfolgte die DNA-Fällung mit Isopropanol statt mit Ethanol, was zu einem 3-fach geringeren Volumenbedarf führte.

Tabelle 15: Salzkonzentration zur DNA-Fällung.

Die Werte in der Spalte Anwendungskonzentration geben die optimale Salzkonzentration zur DNA-Fällung an.

Salz	Lösungskonzentration (mol/l)	Anwendungskonzentration (mol/l)
Ammoniumacetat	10	2,0-2,5
Lithiumchlorid	8	0,8
Natriumchlorid	5	0,2
Natriumacetat	3	0,3

60 μ l eiskalter absoluter Ethanol und 2 μ l 3 mol/l Natriumacetat-Lösung wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. 20 μ l DNA-Extrakt wurden zugeben und für 15 - 60 min bei -20 °C inkubiert. Bei maximaler Umdrehung wurde für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach

wurden 250 µl 70%iger Ethanol zugegeben und erneut bei maximaler Umdrehung für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge für ca. 3 min bei RT getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte mit 20-50 µl Wasser oder TE-Puffer.

2.1.8 DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN

a) Fluorometrische Bestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung der gereinigten DNA erfolgte mit dem Fluorometer DyNA Quant™ 200 (Hoefer®, Pharmacia Biotech) unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffs Bisbenzimid. Der Farbstoff bindet selektiv an DNA, wobei er seine sterische Konformation ändert. Durch Anregung des Komplexes mit Licht der Wellenlänge 365 nm wurde Licht der Wellenlänge 460 nm emittiert, das im Fluorometer gemessen werden konnte.

Eine Kalbsthymus-DNA-Lösung der Konzentration 100 ng DNA/µl oder 1000 ng DNA/µl wurde, je nach der zu erwartenden DNA-Konzentration in der Probe, als Standard verwendet. Das Fluorometer wurde mit 2 µl dieses Standards, der in einer Quarz-Küvette mit 2 ml der Bisbenzimid-Lösung vermischt wurde, kalibriert. Die Kalibrierung wurde so lange wiederholt, bis der angezeigte Wert reproduzierbar wurde. Anschließend wurde die Mischung von 2 µl Proben-DNA mit 2 ml Bisbenzimid-Lösung in der selben Quarz-Küvette hergestellt und im Fluorometer gemessen. Der gemessene Wert in ng/ml Messlösung konnte am Gerät abgelesen werden.

b) Gelelektrophoretische Bestimmung

Die Mengenabschätzung eines DNA-Fragmentes erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.3, Seite 50) von Proben-DNA und einem DNA-Molekulargewichts-Standard aus geschnittener genomischer DNA. Entsprechend der zu erwarteten Fragmentlänge des Amplifikats wurde der DNA Molecular Weight Marker VIII oder IX verwendet, von dem 1 µl und 2 µl (V_{Standard}) auf dem Gel aufgetragen wurden. Von der amplifizierten DNA wurden ca. 2 µl (V_{Probe}) auf das Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde auf dem Gel eine Referenzbande des Standards mit gleicher Intensität wie die Bande der Proben-DNA gesucht. Aus dem Verhältnis der Basenpaare (Bp_{Bande}) der Referenzbande zur Summe der Basenpaare des Standards (Bp_{gesamt}) konnte die Konzentration der Proben-DNA (C_{Probe}) mit der Gleichung 1 berechnet werden.

$$C_{\text{Probe}} (\text{ng}/\mu\text{l}) = \frac{Bp_{\text{Bande}}}{Bp_{\text{gesamt}}} * C_{\text{Standard}} (\text{ng}/\mu\text{l}) * \frac{V_{\text{Standard}} (\mu\text{l})}{V_{\text{Probe}} (\mu\text{l})}$$

Gleichung 1: Mengenabschätzung der DNA in einer Bande.

Die Konzentration der Proben-DNA (C_{Probe}) wird berechnet durch den Quotienten aus der Größe des Amplifikats (Bp_{Bande}) und der Gesamtgröße der DNA eines Standards (Bp_{gesamt}) multipliziert mit der Konzentration des Standards (C_{Standard}) und dem Quotienten aus dem aufgetragenen Volumen von Standard (V_{Standard}) und Proben-DNA (V_{Probe}).

2.2 PCR

2.2.1 PCR-MASTERMIX

Für die Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden folgende Komponenten in einem Mastermix zusammengefügt, bevor sie zu der Proben-DNA gegeben wurden:

Eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), die Nukleotide entsprechend der DNA-Sequenz der Matrize bindet, wurde verwendet. Es wurde die aus gentechnisch modifizierten Organismen hergestellte AmpliTaq Gold™ (5 U/μl) der Firma Perkin-Elmer verwendet, die aufgrund einer chemischen Modifikation inaktiv ist und erst durch etwa 9-12-minütiges Erhitzen auf 92-95 °C vor der PCR vollständig aktiviert wurde. Dadurch wurden PCR-Produkte, die durch unspezifische Bindungen der Primer bei niedrigen Temperaturen während der Lagerung oder der Vorbereitung entstanden sein könnten, vermieden. Laut Herstellerangaben beträgt die optimale Konzentration der Polymerase im Mastermix 2,5 Einheiten und sollte in keinem Fall unter 1 Einheit liegen.

Die Nukleotide (dNTPs) wurden in jeweils gleichen Konzentrationen als dNTP-Mischung im Überschuss zugegeben. Bei PCRs, denen kein Restriktionsverdau folgte, wurde dTTP durch dUTP präventiv im Hinblick auf Kontaminationen (siehe 2.2.3, Seite 49) ausgetauscht. Zur optimalen Amplifikation wurde dUTP doppelt so konzentriert wie die anderen dNTPs eingesetzt, da es von der *Taq*-Polymerase schlechter eingebaut wird.

Es wurden bei jeder PCR zwei Oligonukleotide zugegeben, die als Primer bezeichnet werden und die Grenzen der zu amplifizierenden Sequenz bestimmen. Sie sind in ihrer Sequenz komplementär zur Ziel-DNA und bilden während der PCR mit der Ziel-DNA kurze doppelsträngige Abschnitte, die als Startpunkt für die Polymerase dienen. Die Konzentration der Primer im Mastermix betrug zwischen 0,2 und 1 μmol/l.

Magnesiumionen wurden in Form von Magnesiumchlorid (25 mmol/l) im Konzentrationsbereich von 0,5-5,0 mmol/l zugegeben. Sie bildeten mit den dNTPs einen löslichen Komplex, und wurden als Kofaktor für die Polymeraseaktivität benötigt. Die notwendige Zugabe von Magnesiumionen war abhängig von der in der Probe bereits vorhandenen Ionenkonzentration. Bei Gegenwart von EDTA oder anderen Chelatoren musste die Magnesiumchloridkonzentration erhöht werden, ebenso bei signifikanter Erhöhung der Menge an Proben-DNA oder dNTPs.

Die quantitative Zusammensetzung des Mastermix ist abhängig vom Ansatzvolumen, der Anzahl der Ansätze und der gewählten Menge der Einzelkomponenten.

Zur Überprüfung der Reinheit der Mastermix-Komponenten und des Wassers sowie zur Überprüfung einer Kontamination beim Ansetzen der PCR wurde eine Wasserprobe mitgeführt, bei der die Proben-DNA durch Wasser ersetzt wurde.

Die extrahierte Proben-DNA wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen abgefüllt und kurz vermischt. Für die PCR wurden dünnwandige Gefäße zur schnellen Weitergabe der schnell wechselnden Temperatur des Thermocyclerblocks verwendet. Im PCR-Ansatz-Raum wurde der Mastermix in einem 2 ml Reaktionsgefäß hergestellt und anschließend gemischt. Der Mastermix wurde zu den Proben und der Wasserprobe gegeben. Der Ansatz wurde in den Thermocycler gestellt und das PCR-Programm gestartet.

2.2.2 PCR

Die PCR wurde mit einer initialen Denaturierung der Doppelstränge bei 96 °C, die 10 min dauerte, begonnen. Dadurch konnten unspezifisch bei niedrigen Temperaturen gebundene Primer oder andere Nukleotid-Stücke entfernt werden und die AmpliTaq Gold™ - Polymerase aktiviert werden. Wurde eine schrittweise Aktivierung der Polymerase im Verlauf der Zyklen gewünscht, wurde die Startzeit auf 4-8 min reduziert. Zyklisch wiederholt wurden dann eine kurze Denaturierungsphase für 30-60 s bei 96 °C gefolgt von der Anlagerungsphase (Annealing) für 30-60 s bei 50 und 65 °C. Die Verlängerung der Primer entsprechend der DNA-Sequenz (Extension) erfolgte für 30-120 s bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus wurde noch ein 6 - 8 min langer Vervollständigung (Elongation) ebenfalls bei 72 °C durchgeführt. Anschließend wurde auf 4 °C gekühlt, um weitere Reaktionen zu minimieren.

Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurde der Perkin-Elmer Mastercycler verwendet, der innerhalb des Heizblocks einen Temperaturgradienten von max. 10 °C aufbaute.

2.2.3 VERMEIDUNG VON CARRY-OVER-KONTAMINATIONEN

Uracil-haltige DNA-Fragmente, die durch die Verwendung von dUTP bei der PCR entstehen, wurden mit Hilfe des Enzyms Uracil-DNA-Glycosylase zu kleineren, nicht mehr amplifizierbaren Fragmenten degradiert. Das Enzym spaltet das Uracil von der Ribose ab. Durch Erhitzung geht die Ribose in eine Keto-Enol-stabilisierte Form über, wobei das Phosphat und damit der anhängende DNA-Strang abgespalten wird. Der Erhitzungsschritt führt ferner zur Deaktivierung des Enzyms, so dass die neu entstehenden Amplifikate nicht

gespalten werden. Die Uracil-DNA-Glycosylase behält trotz Inaktivierungsschritt noch eine geringe Aktivität, so dass bei längerer Lagerung die Amplifikate zersetzt werden können.

Dem Mastermix wurden 2 Units Uracil-DNA-Glycosylase zugesetzt; es wurde entsprechend weniger Wasser eingesetzt. Das Thymin des dNTP-Mixes für den PCR-Mastermix wurde durch die doppelte Menge an Uracil ersetzt. Vor dem Schritt der initialen Denaturierung der PCR wurde ein Inkubationsschritt für die Uracil-DNA-Glycosylase bei 20 °C für 10 min eingefügt. Die initiale Denaturierung bei 95 °C betrug mindestens 10 min, um die hitzelabile Uracil-DNA-Glycosylase zu deaktivieren.

2.3 Gelelektrophorese

Die Laufstrecke der DNA in einem Agarosegel in Richtung des positiven Pols ist umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Weiterhin ist die Laufgeschwindigkeit abhängig von der Konzentration der Agarose im Puffer und dem Vernetzungsgrad. Je größer der Vernetzungsgrad oder der Agaroseanteil ist, desto langsamer laufen die Fragmente. Durch die Gelelektrophorese kann so die Größe der PCR-Amplifikate bestimmt werden. Die DNA wird im Gel durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Für ein 1,5%iges Gel zur Trennung von PCR-Produkten wurden 2,25 g Agarose LE in einer 250 ml Platzflasche eingewogen. Zur Trennung von Restriktionsprodukten wurde ein 2,5%iges Gel mit 3,75 g Agarose MS verwendet. Die Agarose wurde in 150 ml 0,5x TBE-Puffer suspendiert. Durch Erwärmung in der Mikrowelle wurde die Agarose gelöst und anschließend auf ca. 60 °C abgekühlt. 15 µl Ethidiumbromid wurden dazugegeben und die Lösung in einen Gelträger gegossen. Nach vollständiger Polymerisation konnte das Agarosegel mit 0,5 x TBE-Puffer in einer Elektrophoresekammer äquilibriert werden.

Je nach der Größe der zu erwartenden Amplifikate wurden jeweils 2 µl Gel-Lade-Puffer Ia oder Ib mit den Farbstandards Bromphenolblau bzw. Xylencyanol vorgelegt. Die Proben, Kontrollen und Längenstandards (Marker) wurden mit Gel-Lade-Puffern vermischt und mit autoklaviertem Wasser auf ein einheitliches Volumen gebracht. Pro Tasche (0,5 cm breit) sollten 100-500 ng DNA aufgetragen werden. Das gesamte Volumen der so vorbereiteten Proben wurde nun auf das Gel aufgetragen. Eine Spannung von 10-20 V/cm Gel wurde für 30-60 min angelegt. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA erfolgte durch Fluoreszenz der DNA unter UV-Bestrahlung in Gegenwart von Ethidiumbromid.

2.3.1 LIGANDEN-GELELEKTROPHORESE

Die Verbindung H.A.-Yellow ist ein Polymer bestehend aus Bisbenzimid und Polyethylenglykol (PEG). Die Substanz H.A.-Red ist an PEG gebundenes 10-Phenyl-Neutralrot. Das Bisbenzimid bindet bevorzugt an AT-reiche, Phenyl-Neutralrot hingegen an GC-reiche Sequenzabschnitte. Durch das damit ebenfalls gebundene PEG erhöht sich die Gesamtmasse der Verbindung, was zu einer geringeren Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld führt. DNA-Sequenzen, die aufgrund gleicher Basenpaaranzahl auch die gleiche Molekülmasse besitzen, und bei der normalen Gelelektrophorese nicht getrennt werden können, weisen mit diesem Zusatz unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten auf. Gleich große DNA-Sequenzen laufen durch diesen Zusatz um so langsamer, je höher ihr Anteil an Adenin und Thymin ist. Sequenzen mit unterschiedlicher Basenfolge aber gleicher Nukleotidzusammensetzung werden hingegen nur schlecht zu unterscheiden sein.

0,5x TBE-Puffer und Agarose wurden durch Erwärmung gelöst. Bei Abkühlung auf 70 °C erfolgte die Zugabe von 1 Einheit H.A.-Yellow/Red pro Milliliter Puffer. Für die Auftrennung der DNA wurde eine Spannung von 10 V / cm Gel angelegt. Die DNA fluoreszierte in Gegenwart von Bisbenzimid nur leicht unter UV-Bestrahlung. Zur Detektion wurde das Gel zusätzlich in einem Ethidiumbromidbad inkubiert.

2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Die DNA wurde durch Restriktionsenzyme an für dieses Enzym spezifischen Stellen geschnitten (= Verdauung). Dadurch entstanden i.d.R. Fragmente unterschiedlicher Länge, die bei der Elektrophorese als unterschiedliche Banden sichtbar wurden. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Anzahl der vorhandenen Schnittstellen der zu verdauenden DNA. Für das Enzym wurde der mitgelieferte bzw. vorgeschlagene Puffer verwendet. Sollten mehrere Enzyme in einem Ansatz verwendet werden, musste sowohl auf ein gleiches Temperaturoptimum, wie auch auf die Enzymaktivität in einem gemeinsamen Puffer geachtet werden.

Nach der PCR wurde mit einem Aliquot eine Auftrennung über Gel-Elektrophorese vorgenommen, ein anderes Aliquot wurde mit den zum Verdau vorgesehenen Restriktionsenzymen versetzt. Der Restriktionsmix aus Restriktionsenzym, Puffer für das Enzym und Wasser wurde entsprechend der Tabelle 16 angesetzt.

Tabelle 16: Berechnung des Restriktionsansatzes mit einem Volumen von je 25 µl.
Zu dem Restriktions-Mastermix von 15 µl werden jeweils 10 µl Probe gegeben.

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Menge pro Ansatz	Gesamtmenge
Wasser			Rest = 12,3 µl	
Puffer	10x	1x	2,5 µl	15 µl x Ansätze
Restriktionsenzym	10 U	2 U	0,2 µl	
DNA			10 µl	-

Pro Ansatz wurden 2,5 µl 10x Enzym-Puffer und 2-5 Einheiten des Restriktionsenzym eingesetzt. Die Differenz des Gesamtvolumens zu 25 µl wurde durch 12,3 µl autoklaviertes Wasser ergänzt. Die Komponenten ohne Proben-DNA wurden zunächst in der erforderlichen Gesamtmenge in einem geeigneten Reaktionsgefäß zusammengemischt. Der Restriktionsmix wurde in 0,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt und 10 µl PCR-Produkte hinzugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei der Temperatur der optimalen Aktivität des Enzyms im Heizblock inkubiert. 5-10 µl des Restriktionsproduktes wurden mit 2 µl Gel-Ladepuffer auf ein 1,5 bis 2%iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung eines DNA-Abschnitts erfolgte aus dem PCR-Produkt. Es werden etwa 30-100 ng amplifizierte und aufgereinigte DNA für einen Sequenzierungsansatz benötigt.

2.5.1 PHENOLISIERUNG ZUR REINIGUNG DES PCR-PRODUKTES

Die Phenolisierung stellt die effizienteste Art der Reinigung von DNA dar. Eine Phenol/Chloroform-Mischung dient zum Trennen von Proteinen und Nukleinsäuren. Das Chloroform denaturiert dabei die Proteine und verbessert die Trennung von wässriger und organischer Phase. Die denaturierten Proteine (z.B. Polymerase oder Restriktionsenzyme) reichern sich in der organischen Phase an, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben. Der Isoamylalkohol reduziert das Schäumen bei der Extraktion. Durch diesen Aufreinigungsschritt wird die *Taq*-Polymerase entfernt.

Ein Volumenteil PIC-Lösung wurde in 0,5 ml (ab 100 µl: 1,5 ml) Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die suspendierte Proben-DNA wurde zugegeben und 2 min gemischt und 10 min bei max. Umdrehungszahl zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Etwas weniger als ein Volumenteil Wasser wurde zu der organischen Phase zugegeben, erneut gemischt und 5 min bei max. Umdrehungszahl zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt.

Nach der Phenolisierung wurden zu der wässrigen Phase 0,1 Volumenteil 3 molare Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumenteile absoluter Ethanol gegeben und der Ansatz zur Fällung der DNA mindestens 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit unter Kühlung zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und für 15 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abpipettiert, so dass der DNA-Niederschlag (Pellet) zurückblieb. Zur Lösung der DNA wurde das Pellet bei RT 2-5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und das von Lösungsmitteln befreite Pellet in 25 µl Wasser aufgenommen.

2.5.2 SEQUENZIERUNGSREAKTION

Die Sequenzierung erfolgte über die enzymatische Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) vorgenommen. Für die Sequenzierungs-Reaktion wird ein Mastermix verwendet, der pro Ansatz nur einen Primer (sense oder antisense) enthält. Ferner ist neben den dNTPs ein geringer Anteil an 3,5-Didesoxyribonukleinsäuren (ddNTP) vorhanden, die einen Abbruch der Polymerisation des DNA-Fragmentes bedingen. Da diese ddNTPs in statistischer Verteilung die dNTPs während der Elongation ersetzen, entstehen Stränge von unterschiedlicher Länge. Die verwendete *Taq*-FS-Polymerase ist so verändert, dass sie ddNTPs gegenüber der unveränderten Polymerase erheblich verstärkt einbaut (Perkin-Elmer, 1997). Dadurch kann die Konzentration der ddNTPs geringer gehalten werden, was den störenden Einfluss dieser markierten Basen bei der Kapillarelektrophorese minimiert.

Die von Enzymen und Primern gereinigten PCR-Amplifikate wurden in PCR-Gefäßen mit einem Sequenzierungs-Mastermix entsprechend der Tabelle 17 zusammengegeben. Die Sequenzierungs-Reaktion wurde mit den fertigen Ansätzen in einen Thermocycler entsprechend dem Temperaturprogramm der Tabelle 18 durchgeführt.

Anschließend wurden die Sequenzierungsprodukte gefällt und in 20 µl Wasser bei RT für 15 bis 30 min auf dem Schüttler gelöst. 16 µl Wasser wurden in Sequenzer-Gefäßen vorgelegt und 4 µl der DNA-Lösung hinzugegeben und gut gemischt.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Sequenzierungs-Ansatzes mit einem Volumen von 20 µl.

Es sollen 30-100 ng der Proben-DNA pro Ansatz in die Sequenzierungs-Reaktion eingesetzt werden.

Substanz	Konzentration	Volumen (µl)
Sequenzierungs-Premix		6
Primer	5 pmol / µl	1
Proben-DNA	30-100 ng / Ansatz	1-13
autoklaviertes Wasser		ad 20

Tabelle 18: Temperaturprogramm der Sequenzierungs-Reaktionen.

Ein abschließender Schritt zur Vollendung der Amplifikate wird nicht benötigt. Als Primer-Anlagerungstemperatur wird die für die jeweilige PCR optimierte Anlagerungs-Temperatur gewählt.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Zyklen
Start	2:00	96	
Denaturierung	0:10	96	
Anlagerung	0:05	Primer-Anlagerungs-Temperatur	25
Fortführung	1:00	60	
Ende	∞	4	

2.5.3 KAPILLARELEKTROPHORESE

Das Gerät und die Steuerungssoftware wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Die mit der Sequenzierungs-Reaktion vorbereitete Proben-DNA wurde durch Anlegen einer Spannung über 10-30 s aus dem Probenbehälter (DNA + Puffer) in die 44 oder 60 cm lange Trennkapillare transferiert. Im elektrischen Feld wurde die DNA der Größe nach in der Kapillare aufgetrennt. Jedes Fragment, das nicht vollständig amplifiziert wurde, enthielt als letzte Base ein ddNTP, welches bei Bestrahlung mit einem Laser fluoreszierte und Licht einer bestimmten Wellenlänge abgab. Die vier unterschiedlichen ddNTPs waren jeweils mit einem anderen Fluorophor markiert und konnten durch Emission von Licht unterschiedlicher Wellenlänge parallel gemessen werden.

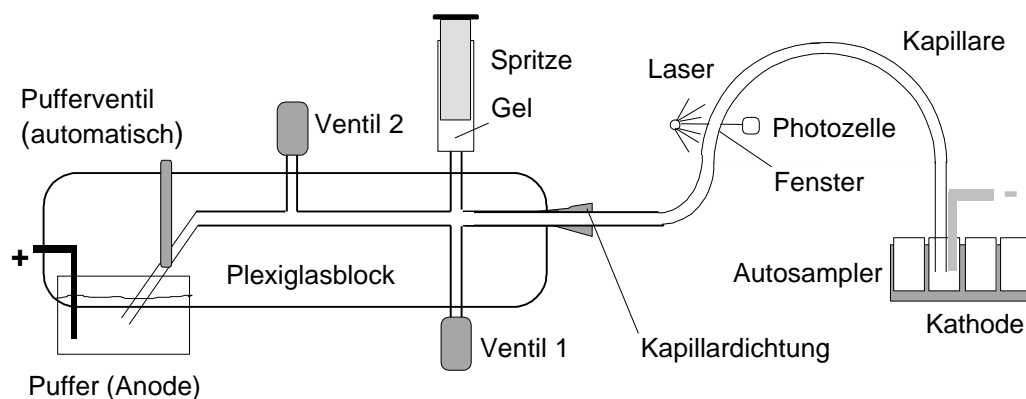


Abbildung 6: Prinzip der Kapillarelektrophorese beim 310 Genetic Analyzer ABI Prismä.

Die DNA-Fragmente laufen von der Kathode aus durch die Kapillare in Richtung Anode und werden dabei ihrer Größe nach aufgetrennt. Noch innerhalb der Kapillare werden die Fragmente durch die Anregung mit einem Laser und die Messung der Transmission detektiert.

Tabelle 19: Parameter für die Kapillarelektrophorese zur Sequenzierung.

Die Laufzeit wird entsprechend der Länge der Kapillare und der Größe der Amplifikate angepasst. Die Injektionszeit wird bei niedrigen Signalstärken erhöht, bei zu hohen Signalstärken erniedrigt.

Parameter	Wert
Injektions-Zeit:	15 s
Injektions-Spannung:	2 kV
Lauf-Spannung:	15 kV
Lauf-Temperatur:	50 °C
Lauf-Zeit:	36 min

2.5.4 AUSWERTUNG DER SEQUENZIERUNGSDATEN

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm Sequencing Analysis von ABI. Der Vergleich verschiedener Sequenzen erfolgte mit dem Programm Sequence Navigator™ von ABI. Die Bestimmung von Restriktionsschnittstellen sowie die Translation der DNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz erfolgte mit dem Programm MacVector™.

2.6 Real-Time-PCR

Der LightCycler™ ermöglicht während der PCR eine fluorometrische Bestimmung sowie nach der PCR eine Schmelzpunkt-Analyse. Mit Hilfe der fluorometrischen Bestimmung kann die Konzentrationsänderung der DNA in den Proben während der PCR verfolgt werden, indem die Messung nach jedem Zyklus durchgeführt wird. Die Proben befinden sich in Glaskapillaren, die in einem 32 Plätze fassenden Karussell stecken. Bei jeder Messung rotiert das Karussell einmal, wobei die Fluorophore durch Laserlicht angeregt werden und die Emission über Photodioden detektiert wird. Die Anregung erfolgt bei 470 nm, die Detektion bei 530 nm (Fluoreszein, Sybr® Green I), 640 nm (LC-Red 640™) und 705 nm (LC-Red 705™). Die Temperierung der Proben erfolgt über die Luft mit Hilfe eines Gebläses und einer Heizspirale.

2.6.1 SYBR® GREEN I

Sybr® Green I bindet überwiegend an dsDNA, wobei sich die Emission stark erhöht. Aus der aufgenommenen Emissionskurve wird über den Wendepunkt die Ausgangskonzentration berechnet. Da hier auch Primer-Dimere und andere unspezifische Produkte erfasst werden, ist zusätzlich die Durchführung einer Schmelzpunkt-Analyse notwendig. Das Auswertungsprogramm bietet derzeit noch keine Möglichkeit, die Fluoreszenz-Anteile unspezifischer DNA-Produkte von der Gesamtfluoreszenz abzuziehen. Die Schmelzpunktanalyse ist daher nur ein Nachweis, ob ein spezifisches Produkt entstanden ist und ob eine Quantifizierung über das Sybr® Green I - Signal überhaupt sinnvoll ist.

Der Mastermix wurde entsprechend der Tabelle 20 hergestellt und mit den Proben in einer Glaskapillare zusammengegeben. Die weitere Analyse ist identisch mit dem Verfahren bei Hybridisierungs sonden.

Tabelle 20: Ansatz des Mastermix mit Sybr® Green I bei einem Ansatzvolumen von 20 µl.

Komponente	Ausgangskonz. (mmol/l)	Endkonz. (mmol/l)	Gesamtmenge (µl)
Wasser			9,6
Magnesiumchlorid	25	4	2,4
Primer sense	20	2	2
Primer antisense	20	2	2
LightCycler™ FastStart DNA Master Sybr® Green I -Premix	10x	1x	2
Proben-DNA			2

2.6.2 HYBRIDISIERUNGSSONDEN

Bei den verwendeten Hybridisierungssonden handelte es sich um zwei Oligonukleotide, die dicht nebeneinander (ca. 3 Basen Abstand) spezifisch an die Ziel-Sequenz gebunden haben. Das als Anker bezeichnete Oligonukleotid war am 5'-Ende mit Fluoreszein markiert, das als Sensor bezeichnete Oligonukleotid war am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff LC-Red640 markiert. Das Fluoreszein am Anker absorbierte das eingestrahlte Licht und emittierte es langwelliger, welches vom LC-Red640 am benachbarten Sensor absorbiert werden konnte. Dieses emittiert darauf hin Licht der Detektionswellenlänge. Vor der Anlagerung und nach der Fortführung erzeugten die Sonden keine Fluoreszenz im Bereich der Detektionswellenlänge, da die Fluoreszenzmarkierungen voneinander getrennt waren.

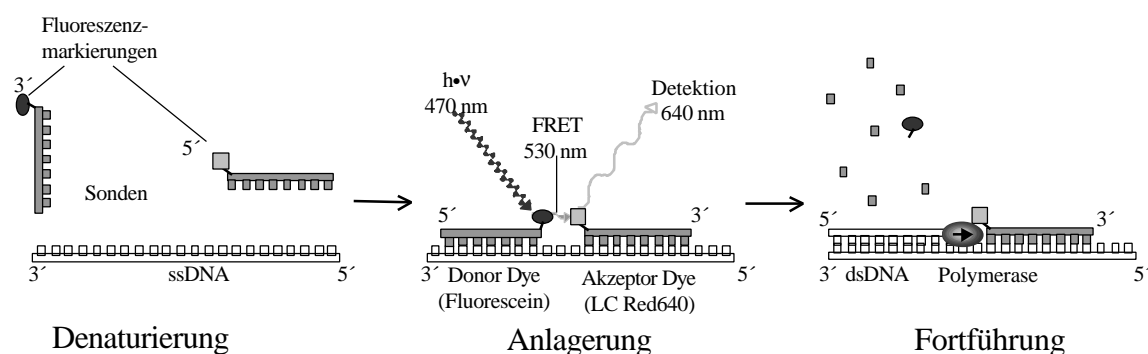


Abbildung 7: Prinzip der Fluoreszenzmessung mit Hybridisierungssonden beim LightCycler™.
Nach dem HybProbe-Prinzip erfolgt eine spezifische Bindung von zwei einfach markierten Sonden auf der Ziel-Sequenz. Die Messung erfolgt hier über die Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffes, der über den FRET Prozess angeregt wird.

Der PCR-Mastermix wurde entsprechend der Tabelle 21 hergestellt und davon je Probe 18 µl in die Messkapillare vorgelegt.

Tabelle 21: Ansatz des Mastermix für die Real-Time-PCR mit Hybridisierungssonden.
Berechnet für ein Ansatzvolumen von 20 µl und einer Magnesiumchloridkonzentration von 4 mmol/l. Verwendet wird eine aus Sensor und Anker bestehende zweiteilige Sonde, die nach der FRET-Technologie arbeitet.

Komponente	Ausgangskonz. (mmol/l)	Endkonz. (mmol/l)	Volumen pro Probe (µl)
Wasser			5,6
Magnesiumchlorid	25	4	2,4
Primer sense	20	2	2
Primer antisense	20	2	2
Sonde (Anker)	20	2	2
Sonde (Sensor)	20	2	2
LightCycler™ FastStart DNA Master Hybridization Probes-Premix	10x	1x	2
Proben-DNA			2

Je 2 µl der Probe wurden zugegeben und die Messkapillare mit Stopfen verschlossen. Die Messkapillare in den Zentrifugenadaptern wurden in einer Zentrifuge bei 2000 U/min etwa 2 min zentrifugiert, damit der Reaktionsansatz sich vollständig im unteren Teil der Kapillare befand. Anschließend wurden die Messkapillare in das Proben-Karussell des LightCyclers™ gesteckt und der Lauf gestartet.

2.6.3 SCHMELZPUNKT-ANALYSE

Die analytische Bestimmung des Schmelzpunktes mit dem LightCycler™ kann auf zwei Wegen erfolgen:

- a) Unter Verwendung von Sybr® Green I, welches sich in die dsDNA einlagert und fluoresziert. Wird die DNA am Schmelzpunkt einzelsträngig, ist das Sybr® Green I nicht mehr gebunden, was zu einer Reduzierung der Fluoreszenz führt. Der Schmelzpunkt ist der Wendepunkt in der Fluoreszenz/Temperatur-Kurve bzw. das Maximum in der erster Ableitung.

- b) Unter Verwendung von HybProbes. Diese zweiteiligen aus Anker und Sensor bestehenden DNA-Sonden lagern sich spezifisch an die Ziel-DNA an und lösen sich bei höheren Temperaturen am Schmelzpunkt ab. Dadurch wird die Fluoreszenz der Sonden reduziert. Bei Verwendung von DNA-Sonden erhält man in der Schmelzpunktanalyse ähnliche Ergebnisse wie mit Sybr[®] Green I, nur dass hier Amplifikate mit unterschiedlicher Basensequenz unter den DNA-Sonden schon bei der Abweichung in einer Base aufgrund von höheren Schmelzpunktveränderungen unterschieden werden können. TaqMan[™]-Sonden eignen sich nicht für die Bestimmung der Schmelztemperatur, da sie keine Fluoreszenzunterschiede zwischen angelagertem und freiem Zustand aufweisen.

Die Bestimmung des Schmelzpunktes erfolgte automatisch im Anschluss an die im LightCycler[™] durchgeführte PCR, wenn diese Phase im Programmablauf vorgesehen wurde.

V ERGEBNISSE

Ziel dieser Doktorarbeit war es zu prüfen, ob bestehende Methoden zur Differenzierung von Tierarten für die Differenzierung von Haus- und Wildschweinen in Lebensmitteln geeignet sind. Dies sollte anhand von zahlreichen Proben verschiedener geographischer Herkunft und verschiedener Abstammung geprüft werden. Weiterhin sollte nach Sequenzabschnitten gesucht werden, die von ihrem Potential her als geeignet für eine Differenzierung von Haus- und Wildschweinen erscheinen. Diese sollten von verschiedenen Proben sequenziert und miteinander verglichen werden. Bei Sequenzabschnitten, die eine Differenzierung von Haus- und Wildschweinen zulassen, sollte eine neue Methode für die Anwendung bei prozessierten Lebensmitteln erstellt werden.

1 EXTRAKTIONSMETHODEN

Die wichtigste Voraussetzung für die erfolgreiche Amplifikation von DNA ist eine gute Extraktion der DNA aus der Probe. Dabei ist es wichtig, dass die DNA möglichst schonend und in möglichst großer Menge extrahiert wird. Weiterhin müssen alle bei der PCR inhibierend wirkenden Stoffe entfernt werden. Für die Untersuchung von stark prozessierten Lebensmitteln ist es wichtig, dass die noch vorhandene degradierte DNA in möglichst großem Umfang extrahiert wird. Zu diesem Zweck wurden die gebräuchlichsten Extraktionsmethoden an der für diese Dissertation relevanten Matrix getestet und optimiert.

1.1 Vergleich der Aufarbeitungsmethoden

Die DNA aus Fleisch verschiedener Verarbeitungsstufen wurde mit vier verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden und in der Folge zwei verschiedenen Reinigungsmethoden extrahiert. Diese basieren auf den Nukleinsäurebindungseigenschaften von Silicagel (Boom *et al.*, 1990). Zudem wurde die einzusetzende Probenmenge und die Probenvorbehandlung optimiert. Eine Übersicht über die durchgeführten Aufarbeitungen gibt Tabelle 22. Die Aufarbeitungsnummer setzt sich wie folgt zusammen:

- Kürzel der Aufarbeitungsmethode:
 - C = CTAB-Methode angelehnt an L-24.01-1 der Methodensammlung nach § 35 LMBG (BgVV, 1997) für den Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Kartoffeln
 - N = Natriumchlorid-Methode nach Wink und Wehrle (1994)
 - G = Guanidin-Hydrochlorid-Methode nach Meyer R. *et al.* (1995)
 - P = Phenol-Methode entsprechend L-08.00-44 der Methodensammlung nach § 35 LMBG (BgVV, 1997) für den Nachweis einer gentechnischen Veränderung von *Lactobacillus curvatus* in Rohwurst

- Proben-Nummer:
 - 1 = Schweinefleisch, geräuchert
 - 2 = Rindfleisch, gekocht
 - 3 = Pute, prozessiert mit Hilfsstoffen (Wurst)
 - 4 = Huhn, rohes Herz
- Art der zusätzlichen Reinigung:
 - Q = zusätzliche Behandlung mit dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN
 - W = zusätzliche Behandlung mit dem Wizard[®] DNA Purification Kit von Promega

Der Zusatz eines „+“ zeigt an, dass das eingewogene Fleischstück nicht mit einem Messer oder dem Ultra-Turrax vorzerkleinert wurde.

Die Ergebnisse der fluorometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration der Extrakte mit dem Hoefer DynaQuant[™] 200 sind in Tabelle 22 aufgeführt und in Abbildung 11 dargestellt. In Abbildung 12 sind die Messwerte bereinigt von Einwaage- und Aufnahmeverminderungen dargestellt.

Die extrahierte DNA wurde einer PCR mit einem Cytb-Universalprimerpaar unterzogen. Die Bewertung der PCR-Ergebnisse erfolgte über die Messung der Stärke der Bandenfluoreszenz (Quantifizierung über ein Auswertungsprogramm) gegenüber der Hintergrundfluoreszenz der Spur. Die Ergebnisse wurden in die Kategorien 0-5 (0 = kein Amplifikat) eingeordnet und zur besseren graphischen Darstellung mit dem Faktor 100 multipliziert. Dieser Wert ist für alle Proben in Tabelle 22 aufgeführt.

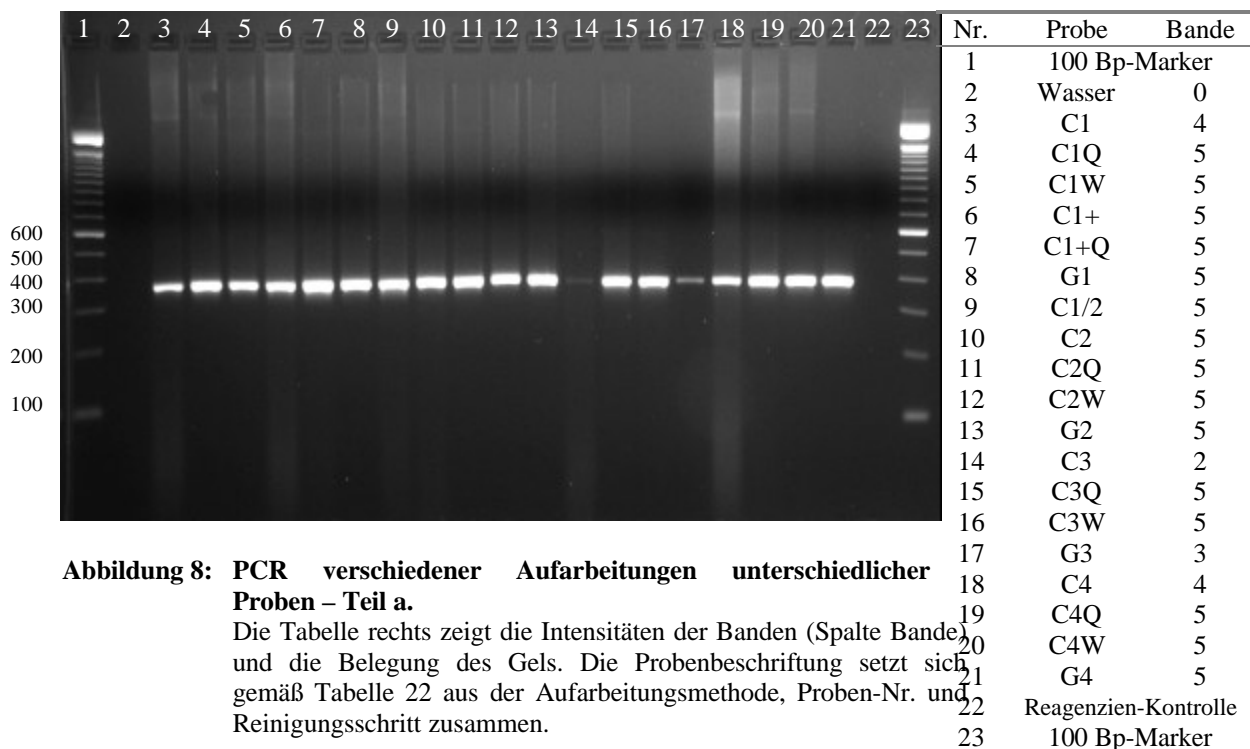


Abbildung 8: PCR verschiedener Aufarbeitungen unterschiedlicher Proben – Teil a.

Die Tabelle rechts zeigt die Intensitäten der Banden (Spalte Bande) und die Belegung des Gels. Die Probenbeschriftung setzt sich gemäß Tabelle 22 aus der Aufarbeitungsmethode, Proben-Nr. und Reinigungsschritt zusammen.

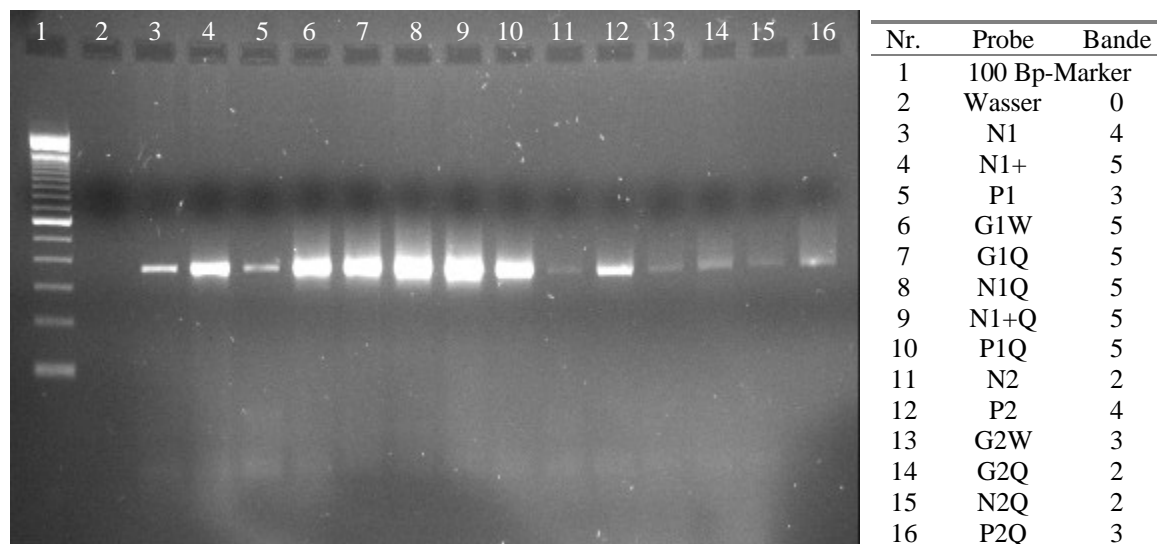


Abbildung 9: PCR verschiedener Aufarbeitungen unterschiedlicher Proben – Teil b.

Die Tabelle rechts zeigt die Intensitäten der Banden (Spalte Bande) und die Belegung des Gels (Spalte Probe). Die Probenbeschriftung setzt sich gemäß Tabelle 22 aus Aufarbeitungsmethode, Proben-Nr. und Reinigungsschritt zusammen.

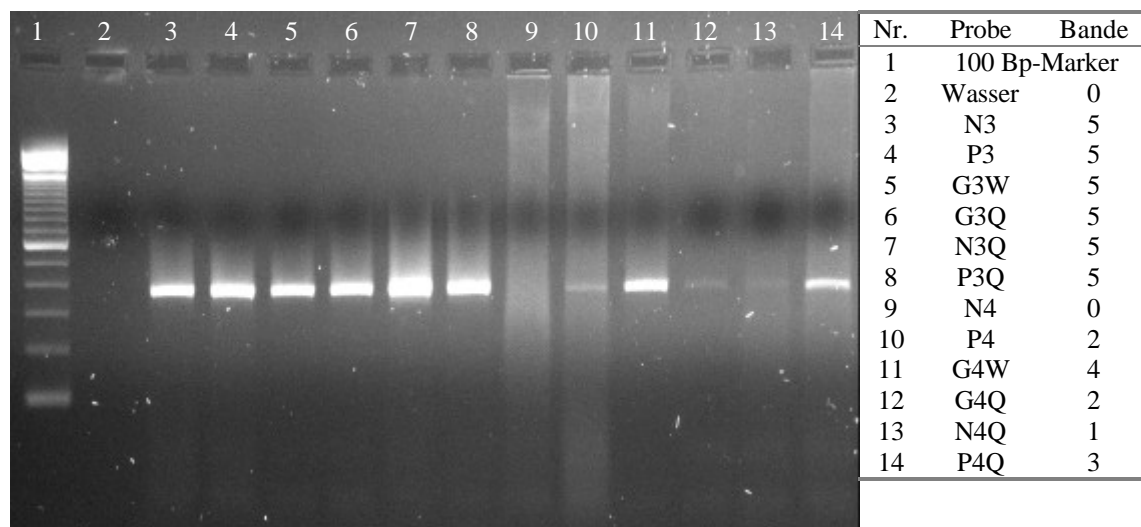


Abbildung 10: PCR verschiedener Aufarbeitungen unterschiedlicher Proben – Teil c.

Die Tabelle rechts zeigt die Intensitäten der Banden (Spalte Bande) und die Belegung des Gels (Spalte Probe). Die Probenbeschriftung setzt sich gemäß Tabelle 22 aus Aufarbeitungsmethode, Proben-Nr. und Reinigungsschritt zusammen.

Tabelle 22: Angewandte Extraktionsmethoden und Messung der extrahierten DNA.
Berechnet wurde die auf die Einwaage bezogene Menge der extrahierten DNA (a) und die aus der Gelelektrophorese erhaltenen Daten über die Bandenintensität, multipliziert mit dem Faktor 100 (b).

Nr.	Tierart	Einwaage (mg)	Zerkleinerung	Extraktionsmethode	Reinigung	extr.DNA (ng/µl)	extr. DNA normiert ^a	Bewertung PCR-Produkt ^b
C1	Schwein	2020	ja	CTAB	-	743	367	400
C1Q	Schwein	2020	ja	CTAB	QIA	200	327	500
C1W	Schwein	2020	ja	CTAB	Wizard	171	277	500
C2	Rind	2010	ja	CTAB	-	272	135	500
C2Q	Rind	2010	ja	CTAB	QIA	115	188	500
C2W	Rind	2010	ja	CTAB	Wizard	91	149	500
C3	Pute	2150	ja	CTAB	-	220	102	200
C3Q	Pute	2150	ja	CTAB	QIA	94	142	500
C3W	Pute	2150	ja	CTAB	Wizard	59	89	500
C4	Huhn	2020	ja	CTAB	-	888	439	400
C4Q	Huhn	2020	ja	CTAB	QIA	530	865	500
C4W	Huhn	2020	ja	CTAB	Wizard	358	584	500
C1+	Schwein	2020	nein	CTAB	-	414	204	500
C1+Q	Schwein	2020	nein	CTAB	QIA	82	132	500
C1/2	Schwein	-	ja	CTAB	-	288	142	500
N1	Schwein	2090	ja	NaCl	-	59	28	400
N1Q	Schwein	2090	ja	NaCl	QIA	34	53	500
N2	Rind	2190	ja	NaCl	-	49	22	200
N2Q	Rind	2190	ja	NaCl	QIA	20	30	200
N3	Pute	2000	ja	NaCl	-	27	13	500
N3Q	Pute	2000	ja	NaCl	QIA	12	20	500
N4	Huhn	2270	ja	NaCl	-	732	322	0
N4Q	Huhn	2270	ja	NaCl	QIA	138	198	100
N1+	Schwein	2070	nein	NaCl	-	60	28	500
N1+Q	Schwein	2070	nein	NaCl	QIA	42	66	500
P1	Schwein	830	ja	Phenol	-	8	9	300
P1Q	Schwein	830	ja	Phenol	QIA	2	7	500
P2	Rind	830	ja	Phenol	-	27	32	400
P2Q	Rind	830	ja	Phenol	QIA	9	33	300
P3	Pute	820	ja	Phenol	-	54	65	500
P3Q	Pute	820	ja	Phenol	QIA	18	69	500
P4	Huhn	810	ja	Phenol	-	661	816	200
P4Q	Huhn	810	ja	Phenol	QIA	284	1155	300
G1	Schwein	840	ja	Guanidin	-	24	126	500
G1Q	Schwein	840	ja	Guanidin	QIA	29	153	500
G1W	Schwein	840	ja	Guanidin	Wizard	3	14	500
G2	Rind	830	ja	Guanidin	-	42	225	500
G2Q	Rind	830	ja	Guanidin	QIA	57	306	300
G2W	Rind	830	ja	Guanidin	Wizard	4	18	200
G3	Pute	810	ja	Guanidin	-	10	54	300
G3Q	Pute	810	ja	Guanidin	QIA	3	14	500
G3W	Pute	810	ja	Guanidin	Wizard	1	4,5	500
G4	Huhn	737	ja	Guanidin	-	515	1256	200
G4Q	Huhn	737	ja	Guanidin	QIA	25	149	200
G4W	Huhn	737	ja	Guanidin	Wizard	121	738	400

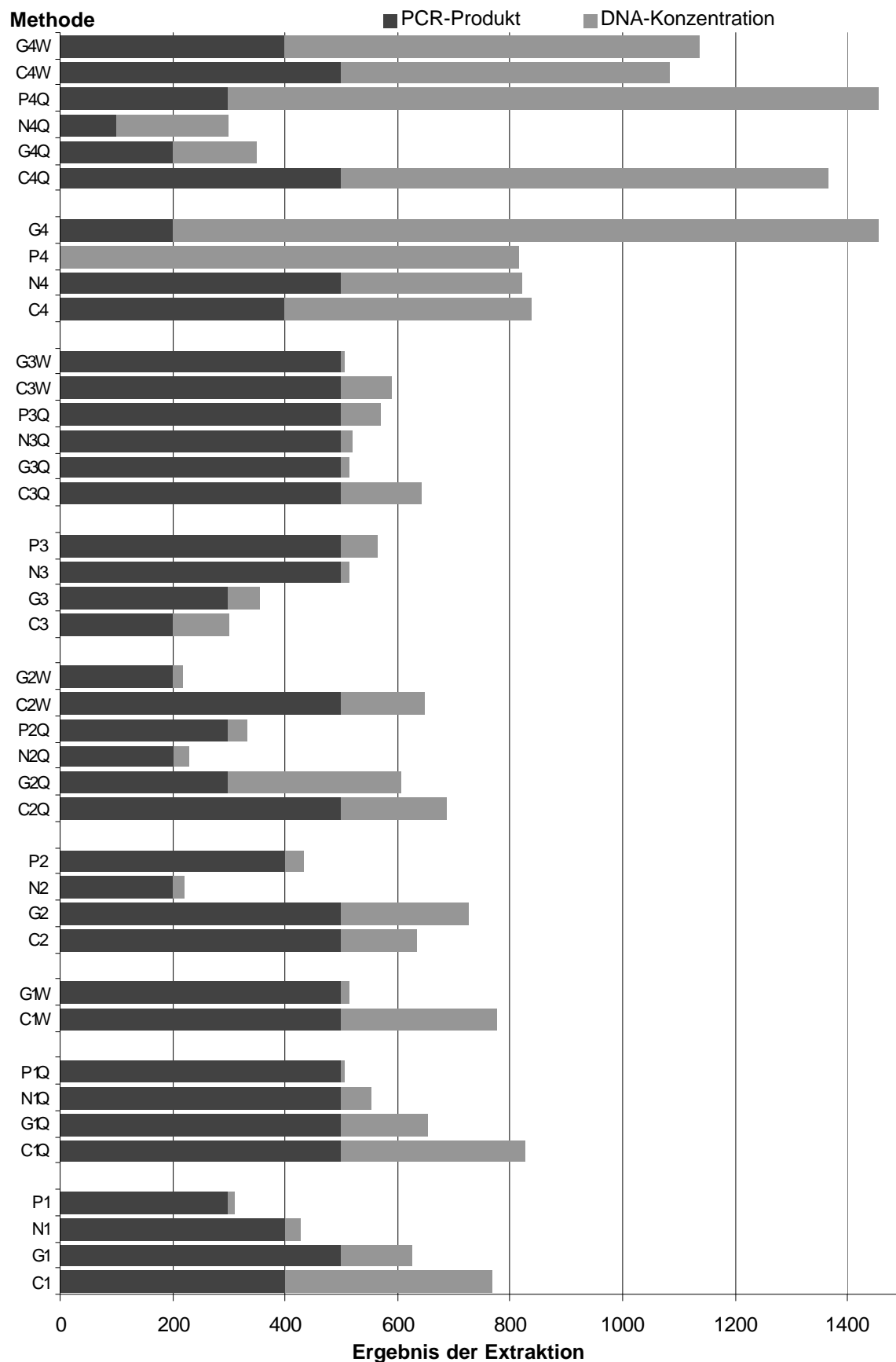


Abbildung 11: Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden bei verschiedenen Verarbeitungsstufen und Tierarten.

Die Güte des Extraktionsergebnisses wird dargestellt durch die Summe der Bewertung des PCR-Produkts (linker Anteil des Balkens) und die extrahierte DNA-Konzentration (rechter Anteil des Balkens).

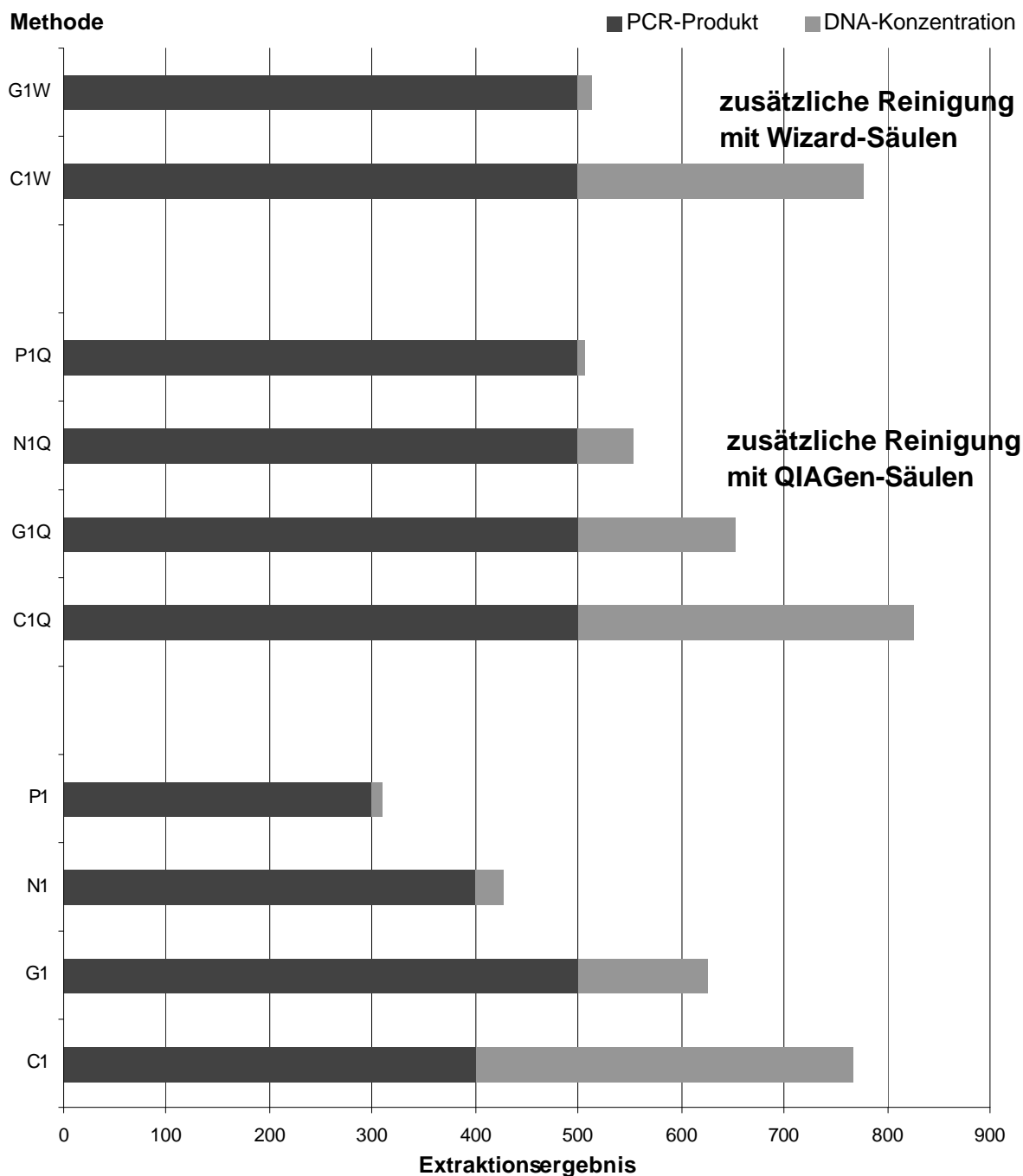


Abbildung 12: Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden beim Schweinefleisch.

Die Güte des Extraktionsergebnisses wird dargestellt durch die Summe der Bewertung des PCR-Produkts (linker Anteil des Balkens) und die extrahierte DNA-Konzentration (rechter Anteil des Balkens).

1.2 Alternative Aufarbeitung für Blutproben

Die Aufarbeitung von Blutproben verschiedener Schweinerassen mit Hilfe der CTAB-Methode ergab kein PCR-Amplifikat. Die Reinigung mit dem „GENERATION Capture Disk Kit“ der Firma Gentra Systems führte nur bei einer von acht Aufarbeitungen zu einem PCR-Amplifikat (siehe Abbildung 13). Die Verwendung des Blut-Extraktionssets der Firma QIAGEN hat bei Verwendung der gereinigten DNA in der PCR bei mehreren Proben zu einem Amplifikat geführt (siehe Abbildung 14). Es konnten aber mit der DNA aus dieser Extraktions-Methode und den Primern DL1f/3r keine 665 Bp großen Amplifikate erzeugt werden.

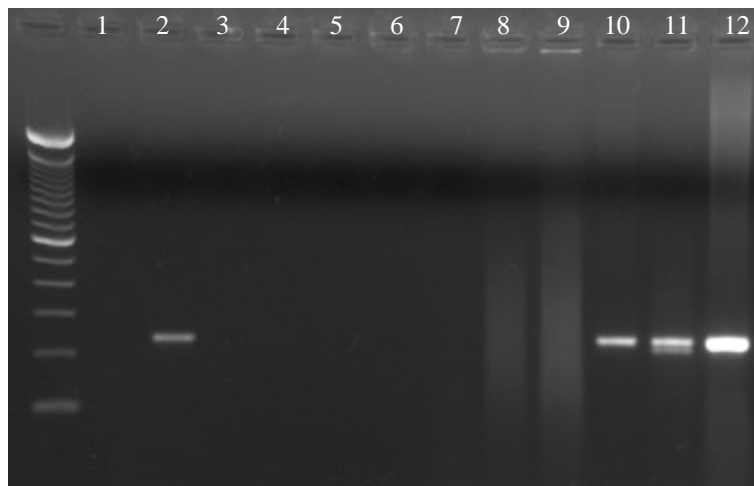


Abbildung 13: Amplifikation von aufgereinigten Blut* - und Kontrollproben mit dem Primerpaar MC 1f/3r.

Nur die DNA der Blutprobe 94 konnte erfolgreich amplifiziert werden.

Nr.	Probe	Taxon	Bande
1	100 Bp-Marker		
2	Wasser		-
3	94*	HS	+
4	84*	HS	-
5	91*	HS	-
6	94*	HS	-
7	101*	HS	-
8	84*	HS	-
9	86*	HS	-
10	91*	HS	-
11	2	Pute	+
12	3	Rind	+
13	4	Huhn	+

Proben-Nr. laut Tabelle 12

Taxon, u.a.:

HS = Haus-, WS = Wildschwein.

* = Blutproben



Abbildung 14: Amplifikation von aufgereinigten Blut-* und Kontrollproben mit den Primerpaaren DL1f/3r (2-15) und MC 1f/3r (16-23).

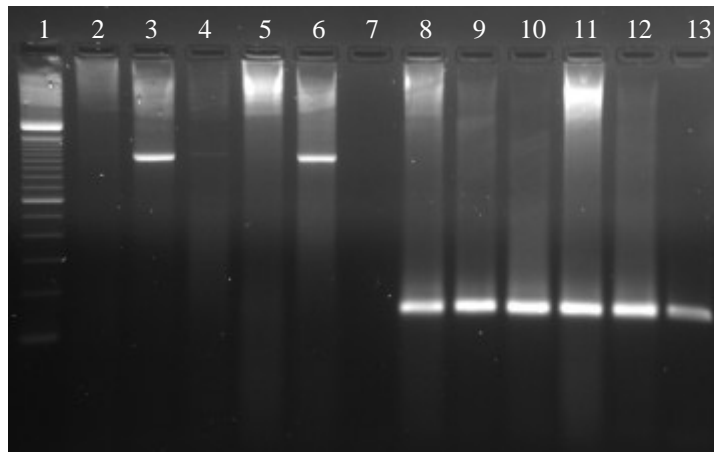
Die PCR mit der DNA der Blutproben 93 und 100 führte zu einem auf dem Gel sichtbaren Amplifikat.

(*Blutproben, zur Verfügung gestellt von: Tierzuchtforschung e.V. München, Institut für Blutgruppenforschung und Immunbiologie)

Nr	Probe	Form	Bande
1	100 Bp-Marker		
2	77	WS	+
3	78	WS	+
4	79	WS	+
5	81	HS	+
6	82	WS	+
7	83	WS	+
8	84*	HS	-
9	93*	HS	-
10	100*	HS	-
11	102*	HS	-
12	103*	HS	-
13	120	WS	+
14	Wasser		-
15	VI	WS	+
16	84*	HS	-
17	93*	HS	+
18	100*	HS	+
19	102*	HS	-
20	103*	HS	-
21	120	WS	+
22	VI	WS	+
23	Wasser		-

1.3 Primer zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der DNA

Zur Kontrolle der Qualität der DNA wurden zwei Eukaryonten-Primerpaare mit unterschiedlich großen Amplifikaten verwendet. Das Primerpaar 41f / 1066r das in L-08.00-44 der Methodensammlung nach § 35 LMBG (BgVV, 1999) als Kontrollsystem verwendet wird, erzeugte Amplifikate der Größe 1025 Bp während das Primerpaar TR03 / TR04 von Allmann *et al.* (1993) Amplifikate der Größe 137 Bp erzeugte.



Nr.	Probe	Primer	Bande
1	100 Bp-Marker		
2	1	41 f/1066 r	-
3	2	41 f/1066 r	+
4	3	41 f/1066 r	-
5	4	41 f/1066 r	-
6	10	41 f/1066 r	+
7	Wasser	41 f/1066 r	-
8	1	TR03+TR04	+
9	2	TR03+TR04	+
10	3	TR03+TR04	+
11	4	TR03+TR04	+
12	10	TR03+TR04	+
13	Wasser	TR03+TR04	+

Abbildung 15: Anwendung verschiedener Eukaryonten-Primer bei unterschiedlichen Tierarten.

Mit dem Primerpaar TR03/04 lässt sich bei allen Proben ein 137 Bp großes PCR-Amplifikat erzeugen, mit dem Primerpaar 41 f/1066 r entstehen nur bei zwei Proben Amplifikate der Größe 1025 Bp.

Die Abbildung 15 zeigt bei Verwendung des Primerpaares 41 f und 1066 r Amplifikate der Größe 1025 Bp bei den Proben Rind und Wildschwein. Die PCR der Proben Schwein, Pute und Huhn ergibt keine auf dem Gel sichtbare Menge an amplifizierter DNA.

Mit dem Primerpaar TR03 und TR04 wird bei allen Proben ein 137 Bp großes Amplifikat erzeugt. Das System ist damit auch zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit extrahierter DNA von stark prozessierten Produkten geeignet und wurde im weiteren Verlauf zur Überprüfung der extrahierten DNA verwendet (nicht dargestellt).

2 CYTOCHROM B-GEN

2.1 PCR

2.1.1 AUFARBEITUNG UND PCR DER WILDSCHWEINPROBEN

Alle untersuchten Proben wurden mit der CTAB-Methode aufgearbeitet, die sich in den Extraktionsversuchen als am besten geeignet erwiesen hat. Einige Proben wurden zusätzlich über QIAGEN-Säulen gereinigt. Mit den aufgearbeiteten Proben wurde eine PCR mit den Primern Cytb 1f-SW und Cytb 2r-SW vorgenommen. Hierbei handelt es sich um

abgewandelte Consensus-Primer nach Meyer R. *et al.* (1995), die an die Sequenz von Hausschwein angepasst wurden und ebenfalls ein 359 Bp großes Amplifikat ergeben.

Bei allen Proben wurde sowohl bei Verwendung eines für Schweine spezifischen Primerpaares, als auch bei Verwendung eines Universal-Primerpaares ein Amplifikat von 359 Bp erzeugt. Weitere Amplifikate, die durch unspezifische Bindungen hervorgehen würden, konnten nicht beobachtet werden. Die nicht über eine Säule gereinigten Proben zeigten nach der PCR bei der Gelelektrophorese einen stärker fluoreszierenden Hintergrund in der Spur als die über QIAGEN-Säulen gereinigten Proben.

Zur Ermittlung der optimalen Amplifikationsbedingungen des *cytB*-Abschnitts bei Wildschweinproben wurden folgende PCR-Parameter variiert:

- Annealing-Temperatur zwischen 50 und 70 °C
- Zyklenzahl mit 25, 30 und 35 Zyklen
- Magnesiumchlorid-Konzentration mit 1, 2, 3 und 4 mmol/l Magnesiumchlorid

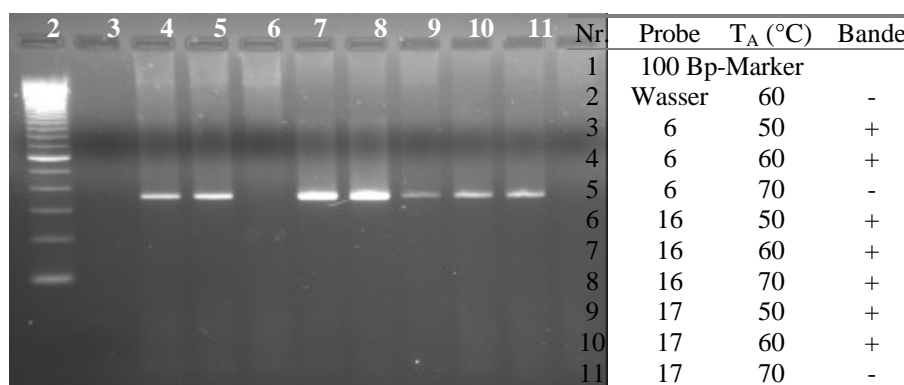


Abbildung 16: Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur der Primer Cytb 1fSW/2-SW.

Nur bei Wildschwein-Probe 16 ist bei einer Annealingtemperatur (T_A) von 70 °C noch ein Amplifikat zu sehen. Das Amplifikat bei einer T_A von 60 °C ist bei allen Proben am stärksten.

Die berechnete Schmelztemperatur für die im Test verwendeten Schweine-spezifischen Primer Cytb 1f-SW und Cytb 2r-SW lag bei 73 °C. Abbildung 16 zeigt, dass bei einer Annealing-Temperatur von 70 °C nur bei einer Probe eine schwache Amplifikat-Bande entstand, während bei 50 und 60 °C eine ausreichende Menge an Amplifikat erhalten wurde. Bei einer Annealingtemperatur von 70 °C entsteht ein ausreichendes Amplifikat erst bei 35 Zyklen (nicht gezeigt). Die Abbildung 16 macht deutlich, dass bei niedrigerer Temperatur die Bandenintensitäten stärker wurden, ohne dass unspezifische Amplifikate entstanden. Alle eingesetzten Magnesiumchloridkonzentrationen ergaben bei den Annealingtemperaturen 50, 55 und 60 °C im Agarosegel gut sichtbare PCR-Produkte (nicht abgebildet).

Die Versuche ergaben, dass ein optimales PCR-Produkt bei allen Proben mit einer Zyklenzahl von 35 erhalten wurde. Bei einer Zyklenzahl von 30 konnte nur bei niedrigen Annealing-

Temperaturen ein gutes Ergebnis erzielt werden. Bei einer Zyklenzahl von 25 wurde bei allen getesteten Temperaturen ein schlechteres bzw. gar kein Ergebnis erhalten.

Die optimale Annealing-Temperatur für die PCR an Haus- und Wildschweinen mit Cytochrom b - Universalprimern liegt zwischen 50 °C und 60 °C unter Verwendung von mindestens 1,5 mmol/l Magnesiumchlorid und einer Zyklenzahl von 35. Für die weiteren PCR mit Wildschweinen wird daher eine 3-Stufen PCR mit 35 Zyklen, einer Annealing-Temperatur von 55 °C und einer Magnesiumchloridkonzentration von 1,5 mmol/l verwendet.

2.1.2 VARIATIONEN DER PRIMER

Für die PCR verschiedener Tierarten werden Primer benötigt, die an alle Arten gleich gut binden. Dies gilt besonders, wenn die DNA verschiedener Arten in einer Mischung amplifiziert werden soll. Das Universal-Primerpaar Cytb 1f-UP und Cytb 2r-UP wurde für diese Zwecke von Meyer R. *et al.* (1995) vorgeschlagen und vielfach angewandt. Für den spezifischen Nachweis von Schweinen und eine folgende Sequenzierung wurde anhand der DNA-Sequenz vom Hausschwein aus der GenBank (Benson *et al.*, 2000) das spezifische Primerpaar Cytb 1f-SW und Cytb 2r-SW entwickelt. Für weitere Tierarten wurden anhand von Datenbank-Sequenzvergleichen (Altschul *et al.*, 1997) die am stärksten variierenden Nukleotidpositionen bestimmt und eine Mischung von Primern verwendet, die für die meisten Tierarten exakt passen, während das Cytb-UP Primerpaar vielfach Mismatches aufweist.

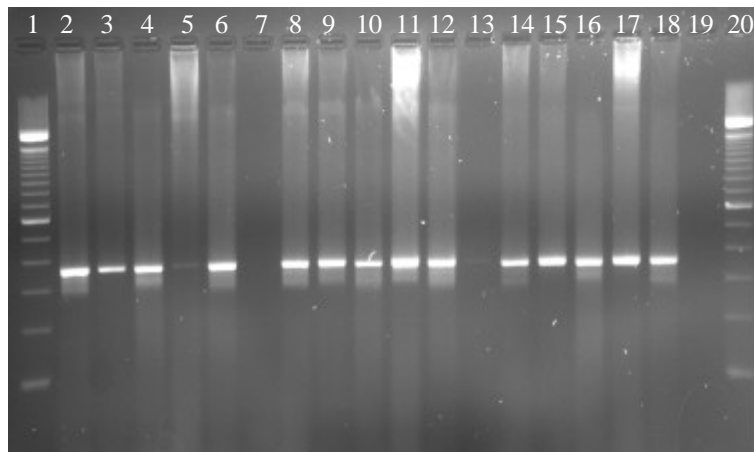


Abbildung 17: Verwendung verschiedener Primer in der PCR bei verschiedenen Tierarten.

Mit den Universalprimern und den Wobble-Primern wurde die DNA aller untersuchten Tierarten gleich gut amplifiziert.

Nr.	Probe	Primer	Bande
1	100 Bp-Marker		
2	1	Cytb-SW	+
3	2	Cytb-SW	+
4	3	Cytb-SW	+
5	4	Cytb-SW	(+)
6	10	Cytb-SW	+
7	Wasser	Cytb-SW	-
8	1	Cytb-UP	+
9	2	Cytb-UP	+
10	3	Cytb-UP	+
11	4	Cytb-UP	+
12	10	Cytb-UP	+
13	Wasser	Cytb-UP	-
14	1	Cytb-WO	+
15	2	Cytb-WO	+
16	3	Cytb-WO	+
17	4	Cytb-WO	+
18	10	Cytb-WO	+
19	Wasser	Cytb-WO	-
20	100 Bp-Marker		

Beschriftung:

Proben-Nr. gemäß Tabelle 12.

Abbildung 17 zeigt, dass mit dem für Schweine spezifischen Primerpaar Cytb-SW bei den Tierarten Huhn (4) und Rind (2) geringere Bandenintensitäten als bei Schwein (1), Pute (3) und Wildschwein (10) entstanden. Bei der PCR mit dem Universal-Primerpaar Cytb-UP und dem Primerpaar Cytb-WO wiesen alle Proben starke Bandenintensitäten auf.

2.2 RFLP

Die nach der Methode von Meyer R. *et al.* (1995) amplifizierte DNA von Wild- und Hausschweinen wurde der RFLP mit dem Restriktionsenzym *HinfI* unterzogen. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Restriktion von Wildschweinproben nach der gelelektrophoretischen Auftrennung. Die Amplifikate der Proben 6, 8, 9 und 10 wurden durch die Restriktionsendonuklease *HinfI* mit der Erkennungssequenz G /ANTC in die Fragmente 161 und 198 Bp geschnitten. Die Hausschweinprobe und die anderen Wildschweinproben auf diesem Gel weisen Fragmente der Größe 359 Bp auf und wurden von *HinfI* nicht geschnitten. Die entstandenen Fragmente der RFLP aller untersuchten Proben sind in Tabelle 23 aufgeführt.

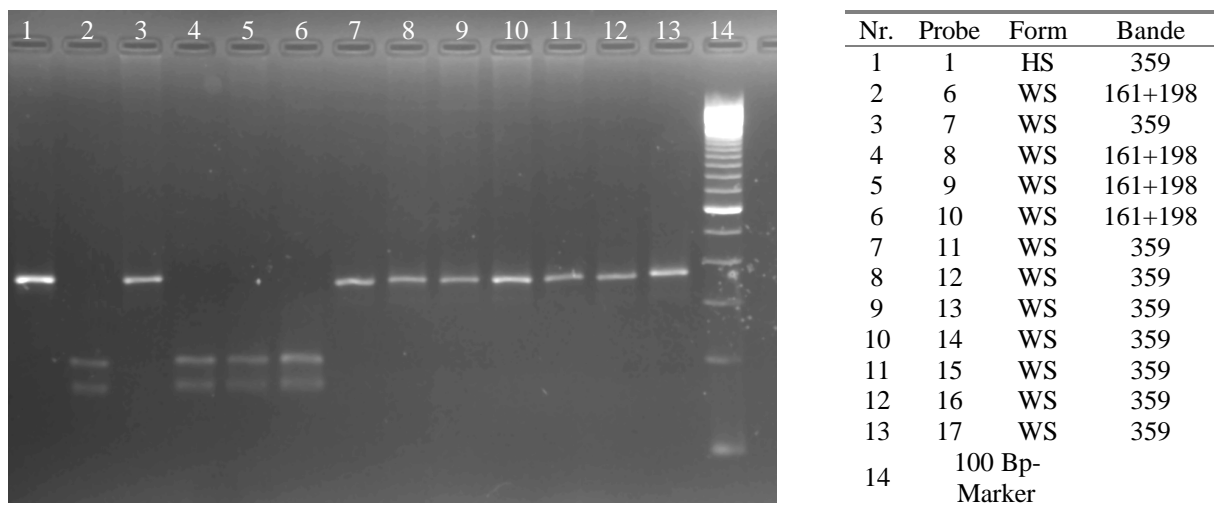


Abbildung 18: RFLP mit *HinfI* des Amplifikats der Primer Cytb 1f/2r.

Die Amplifikate der DNA von den Wildschweinproben 6, 8, 9 und 10 wurden in die Fragmente 161 und 198 Bp geschnitten, die Amplifikate der Hausschweinprobe 1 und der restlichen Wildschweinproben blieben ungeschnitten.

Tabelle 23: Übersicht der *HinfI*-Schnitte bei Wildschweinproben (S= sequenziert).

Bei 15 der 73 aufgeführten Wildschweinproben wurden durch *HinfI* das Amplifikat in die Fragmente 161+198 geschnitten, die Amplifikate der 20 untersuchten Hausschweinproben blieben ungeschnitten.

Nr	Form	Restriktions- fragmente (Bp)	sequen- ziert	Nr	Form	Restriktions- fragmente (Bp)	sequen- ziert
1	Hausschwein	359	S	48	Wildschwein	359	
5	Hausschwein	359	S	49	Wildschwein	359	
6	Wildschwein	161+198	S	50	Wildschwein	359	
7	Wildschwein	359	S	51	Wildschwein	359	
8	Wildschwein	161+198	S	52	Wildschwein	359	
9	Wildschwein	161+198	S	53	Wildschwein	359	
10	Wildschwein	161+198	S	54	Wildschwein	359	
11	Wildschwein	359	S	55	Wildschwein	359	
12	Wildschwein	359	S	62	Wildschwein	161+198	S
13	Wildschwein	359	S	63	Wildschwein	359	
14	Wildschwein	359	S	64	Wildschwein	359	S
15	Wildschwein	359	S	65	Wildschwein	359	S
16	Wildschwein	359	S	66	Wildschwein	161+198	S
17	Wildschwein	359	S	67	Wildschwein	359	S
18	Wildschwein	161+198	S	68	Wildschwein	359	S
19	Wildschwein	161+198	S	69	Wildschwein	359	S
20	Wildschwein	161+198		70	Wildschwein	359	
21	Wildschwein	161+198	S	71	Wildschwein	359	S
22	Wildschwein	161+198	S	72	Wildschwein	359	
23	Wildschwein	359		73	Wildschwein	161+198	S
24	Wildschwein	359		74	Wildschwein	359	
25	Wildschwein	359		75	Wildschwein	359	
26	Wildschwein	359		76	Wildschwein	161+198	
27	Wildschwein	359		77	Wildschwein	359	
28	Wildschwein	359		78	Wildschwein	359	
29	Wildschwein	359	S	128	Hausschwein	359	S
30	Wildschwein	359	S	129	Hausschwein	359	S
31	Wildschwein	359	S	130	Hausschwein	359	S
32	Wildschwein	359	S	131	Hausschwein	359	S
33	Wildschwein	359		132	Hausschwein	359	
34	Wildschwein	359		133	Hausschwein	359	S
35	Wildschwein	359		134	Hausschwein	359	
36	Wildschwein	359		135	Hausschwein	359	
37	Wildschwein	161+198	S	137	Hausschwein	359	S
38	Wildschwein	359		138	Hausschwein	359	S
39	Wildschwein	359		139	Hausschwein	359	
40	Wildschwein	359		140	Hausschwein	359	S
41	Wildschwein	359		141	Hausschwein	359	S
42	Wildschwein	359		142	Hausschwein	359	S
43	Wildschwein	359		143	Hausschwein	359	S
44	Wildschwein	359		144	Hausschwein	359	
45	Wildschwein	359		145	Hausschwein	359	
46	Wildschwein	359		146	Hausschwein	359	S
47	Wildschwein	359					

Die Tabelle 23 zeigt, dass nur die DNA-Sequenz des kleineren Teils der Wildschweinproben von *HinfI* geschnitten wurde. Eine erneute DNA-Extraktion mit anschließender Säulenreinigung, PCR und RFLP führte zu den gleichen Ergebnissen. Der Anteil der Proben, deren DNA-Sequenzen von *HinfI* geschnitten wird, beträgt 21 %.

Tabelle 24: Auswertung der RFLP-Analytik des Cytb 1f/3r-Amplifikats mit dem Restriktionsenzym *HinfI*.

Die Amplifikate der 20 untersuchten Hausschweinproben wurden nicht geschnitten, 21 % der Amplifikate der Wildschweinproben wurden geschnitten.

	Wildschweinproben		Hausschweinproben	
kein Schnitt:	58	(79 %)	20	(100 %)
Schnitt:	15	(21 %)	0	
Gesamt:	73		20	

2.3 Sequenzierung

Das *cytB*-Gen liegt in der mitochondrialen DNA beim Schwein in den Basenpositionen 14194-15334 (Gadaleta *et al.*, 1989). Das Amplifikat, das die Primer Cytb 1f-SW und Cytb 2r-SW erzeugen, ist 359 Bp lang und reicht von Nukleotid-Position 70 bis 428 des 1141 Bp langen *cytB*-Gens. Zur Ermittlung der Gründe für das unterschiedliche Restriktionsverhalten der Wildschweinproben wurde dieser Abschnitt bei zahlreichen Referenzproben sequenziert (Abbildung 19 bis Abbildung 21).

	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cytb1f2r-1	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-5	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-128	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-129	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-130	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-131	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-133	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-137	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-138	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-140	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-141	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-142	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-143	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-146	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
<i>Ferg1. HS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytb1f2r-6	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-7	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-8	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-9	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-10	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-11	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-12	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-13	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-14	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-15	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-16	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-17	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-18	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-19	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-21	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-22	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-29	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-30	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-31	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-32	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-37	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-61	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-62	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-64	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-65	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-66	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-67	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-68	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-69	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-71	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Cytb1f2r-73	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
<i>Ferg2. WS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cons. HS</i>	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
<i>Cons. WS</i>	C	CCTCAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT
Vergl. HS-WS	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbildung 19: Vergleich der DNA-Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen)- und Wildschweinen (untere Sequenzen) im ersten Teil des Cytb1f/2r-Amplifikates.

An Position 127 des *cytB*-Gens tritt bei 10 der 31 Wildschweine, deren DNA sequenziert wurde, ein Basenaustausch von T nach C auf.

Abbildung 20: Vergleich der DNA-Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen)- und Wildschweinen (untere Sequenzen) im zweiten Teil des *Cytb1f/2r*-Amplifikates.
An den Positionen 234 und 235 des *cytB*-Gens treten bei 17 Wildschweinen Sequenzunterschiede gegenüber den Hausschweinen auf. Alle weiteren Unterschiede in diesem Abschnitt sind auf Hausschwein 5 beschränkt.

ERGEBNISSE
CYTOCHROM B-GEN

	340	350	360	370	380	390	400	410	420
Cytlb1f2r-1	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-5	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-128	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-129	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-130	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-131	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-133	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-137	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-138	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-140	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-141	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-142	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-143	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-146	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----*	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cytlb1f2r-6	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-7	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-8	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-9	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-10	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-11	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-12	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-13	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-14	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-15	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-16	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-17	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-18	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-19	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-21	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-22	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-23	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-29	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-30	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-31	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-32	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-37	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-61	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-62	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-64	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-65	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-66	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-67	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-68	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-69	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-71	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
Cytlb1f2r-73	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
<i>VERGLE. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
<i>Cons. WS</i>	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC	CCTGAGGACA	AATATCATTC
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----*	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	430	440	450	460	470	480	490	500	510
Cytlb1f2r-1	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-5	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-128	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-129	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-130	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-131	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-133	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-137	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-138	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-140	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-141	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-142	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-143	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-146	TGAGGAGC								
<i>Fergl. HS</i>	-----								
Cytlb1f2r-6	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-7	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-8	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-9	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-10	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-11	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-12	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-13	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-14	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-15	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-16	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-17	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-18	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-19	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-21	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-22	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-29	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-30	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-31	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-32	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-37	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-61	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-62	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-64	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-65	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-66	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-67	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-68	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-69	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-71	TGAGGAGC								
Cytlb1f2r-73	TGAGGAGC								
<i>VERGLE. WS</i>	-----								
<i>Cons. HS</i>	TGAGGAGC								
<i>Cons. WS</i>	TGAGGAGC								
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----								

Abbildung 21: Vergleich der DNA-Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen)- und Wildschweinen (untere Sequenzen) im dritten Teil des Cytlb1f2r-Amplifikates.

In diesem Abschnitt des Cytlb 1f/2r-Amplifikates tritt nur ein Sequenzunterschied zwischen den sequenzierten Individuen an Position 354 des *cytlb*-Gens bei Hausschwein 5 auf.

Bei der Sequenzierung der Proben mit *HinfI*-Schnittstelle und einer Auswahl der Proben ohne diese Schnittstelle zeigten sich an drei Positionen in dem amplifizierten *cytB*-Abschnitt Sequenzabweichungen der Wildschweine von Hausschweinen. Vier der 36 sequenzierten Wildschweinproben wiesen in dem amplifizierten DNA-Abschnitt gegenüber dem Hausschwein zwei Abweichungen auf, 19 Proben eine Abweichung und 9 Proben waren mit dem Hausschwein sequenzgleich. Alle Proben, deren DNA-Sequenz von *HinfI* geschnitten wurden, wiesen gegenüber dem Hausschwein nur einen Thymin-Cytosin-Basenaustausch an Position 234 auf. Die vier Proben mit zwei Sequenzunterschieden zum Hausschwein weisen an Position 127 einen Adenin-Guanin-Austausch und an Position 235 einen Thymin-Cytosin-Austausch auf. Die restlichen Proben mit Sequenzunterschieden zum Hausschwein weisen an Position 235 einen Thymin-Cytosin-Austausch auf. Eine Übersicht gibt die Tabelle 25.

Tabelle 25: Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen im Abschnitt des Cytb 1f/2r-Amplifikats.

Es sind die sich aus der DNA-Sequenz ergebenden Möglichkeiten zur Identifizierung einer Probe als Wildschwein über die RFLP-Analytik oder die Sequenzierung aufgeführt.

Probe	Form	Base im <i>cytB</i> -Gen an Position			Probe ist als Wildschwein identifizierbar über	
		127	234	235	RFLP	Sequenzierung
1	HS	T	T	A		
5	HS	T	T	A		
6	WS	T	C	A	x	x
7	WS	C	T	A		x
8	WS	T	C	A	x	x
9	WS	T	C	A	x	x
10	WS	T	C	A	x	x
11	WS	T	T	A	-	-
12	WS	C	T	G	-	x
13	WS	T	T	A	-	-
14	WS	C	T	A	-	x
15	WS	T	T	A	-	-
16	WS	T	T	A	-	-
17	WS	C	T	A	-	x
18	WS	T	C	A	x	x
19	WS	T	C	A	x	x
21	WS	T	C	A	x	x
22	WS	T	C	A	x	x
29	WS	T	T	A	-	-
30	WS	C	T	A	-	x
31	WS	C	T	A	-	x
32	WS	T	T	A	-	-
37	WS	T	C	A	x	x
61	WS	T	C	A	x	x
62	WS	T	C	A	x	x
64	WS	C	T	G	-	x
65	WS	C	T	G	-	x
66	WS	T	C	A	x	x
67	WS	T	T	A	-	-
68	WS	T	T	A	-	-
69	WS	C	T	G	-	x
71	WS	C	T	A	-	x
73	WS	T	C	A	x	x
128	HS	T	T	A		
129	HS	T	T	A		
130	HS	T	T	A		
131	HS	T	T	A		
133	HS	T	T	A		
137	HS	T	T	A		
138	HS	T	T	A		
140	HS	T	T	A		
141	HS	T	T	A		
142	HS	T	T	A		
143	HS	T	T	A		
146	HS	T	T	A		

Die Tabelle 26 fasst die Ergebnisse der Sequenzanalysen zusammen und zeigt die Anzahl an Individuen, die eine der drei vorkommenden Basensubstitutionen aufweisen. Zu beachten ist, dass nahezu alle Wildschweinproben sequenziert wurden, die zuvor in der RFLP mit *HinfI* geschnitten worden sind. Die Auswahl an Sequenzierungsproben und damit das Verhältnis von Wildtyp zu Mutante ist daher nicht repräsentativ für die Grundgesamtheit der Proben.

Tabelle 26: Übersicht der Sequenzabweichungen im Cytb 1f/2r-Abschnitt.

Die Basensubstitution an Position 234 ist die bei Wildschweinen am häufigsten vorkommende Mutationen im *cytB*-Gen, die eine Differenzierung zu Hausschweinen erlaubt.

Form	Anzahl	Basenaustausch im Vergleich zu Hausschwein Probe 1			
		T → C 127	T → C 234	A → G 235	kein
HS	14 (31 %)	0	0	0	14 (100 %)
WS	31 (69 %)	10 (32 %)	13 (42 %)	4 (13 %)	8 (26 %)
alle	45	10	13	4	22

Probe Nr. 5 (Hausschwein) weist über die in Tabelle 26 genannten Sequenzunterschiede hinaus noch fünf weitere Mutationen gegenüber den übrigen Proben auf, die in der Tabelle 27 einzeln aufgeführt sind.

Tabelle 27: Sequenzabweichungen von Hausschwein Probe Nr. 5 gegenüber den anderen sequenzierten Haus- und Wildschweinen.

Dargestellt sind die Nukleotide der anderen Proben und von Probe Nr. 5 an der entsprechenden Position des *cytB*-Gens

Position	207	243	267	303	354
Basenaustausch	T → C	T → C	A → G	T → C	C → T

In Abbildung 22 ist ein Ausschnitt (Position 225-244 des *cytB*-Gens) des Bereichs der *HinfI* - Schnittstelle als Elektropherogramm dargestellt. Probe 22 zeigt eine von Probe 1 und 15 abweichende Basenfolge an Position 234 des *cytB*-Gens (Pfeil), an der Thymin durch Cytosin ersetzt wurde. Die Sequenzen unterscheiden sich innerhalb des amplifizierten 359 Bp großen Abschnitts nur an dieser Nukleotidposition.

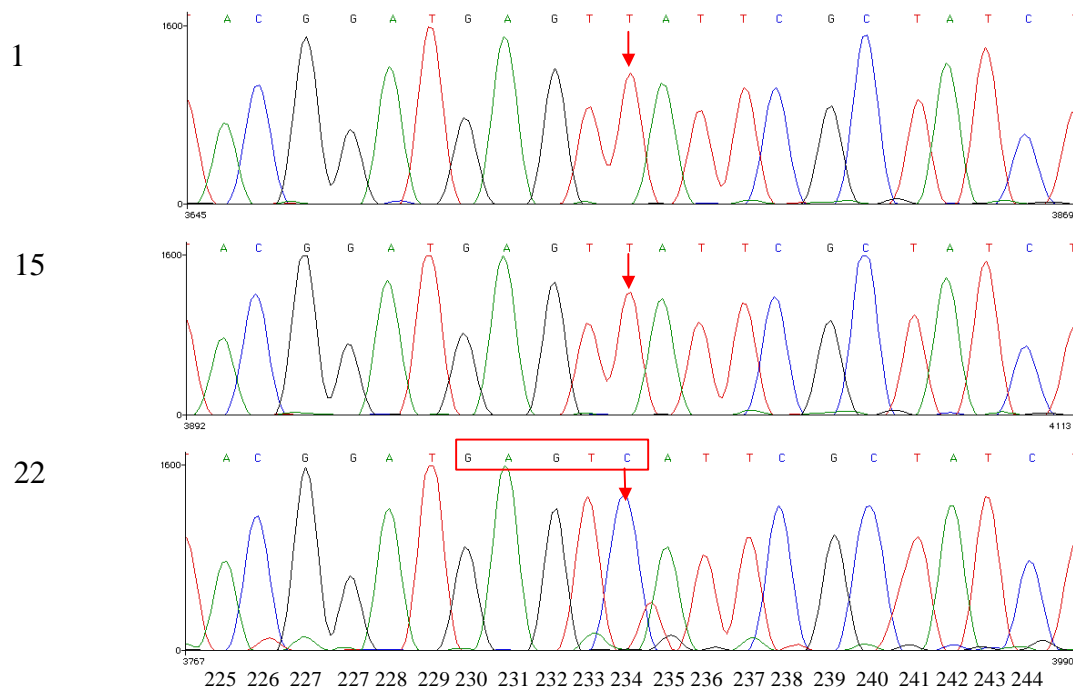


Abbildung 22: Elektropherogramm eines *cytB*-Bereichs von Haus- und Wildschweinen.

Hausschwein Nr. 1, Wildschwein Nr. 15 dessen Sequenz mit *HinfI* nicht geschnitten wird und Wildschwein Nr. 22, einem Wildschwein, dessen DNA-Fragment geschnitten wird. Eingrahmt ist die Erkennungssequenz von *HinfI*, die hier nur bei Wildschweinprobe 22 vorhanden ist. Die

Basenunterschiede an Position 127 und 235 des *cytB*-Gens lassen sich RFLP-analytisch nicht nachweisen, da es keine Restriktionsenzyme gibt, die diese Basenfolge differenzieren können (Stand 2000, MacVector™). Die schneidenden Restriktionsenzyme sind daher in diesem Bereich bei beiden Sequenzvarianten identisch.

2.4 Ermittlung neuer Sequenzabschnitte zur Differenzierung anhand von Sequenzvergleichen auf dem *cytB*-Gen

Weitere Bereiche des *cytB*-Gens neben dem 359 Bp-Abschnitt von Meyer *et al.* (1995) wurden im Hinblick auf Differenzierungsmöglichkeiten von Unterarten untersucht. Die Datenbankrecherche bei GenBank (Benson *et al.*, 2000) zeigte, dass unter Tieren verschiedener Ordnungen innerhalb der Klasse der Mammalia starke Unterschiede in der DNA-Sequenz vorhanden sind (Abbildung 23). Hier wurde die Sequenz von Schwein (*Sus scrofa*), Rind (*Bos taurus*), Springbock (*Antidorcas marsupialis*) und Maus (*Mus musculus*) verglichen. Die Unterschiede nehmen beim Vergleich von Tieren verschiedener Arten einer Gattung nur leicht ab (Abbildung 24). Verwendet wurden hier die Sequenzen des *cytB*-Gens von Tieren der Gattung *Hylobates* (Gibbon-Affen), da diese aufgrund einer Untersuchung über die Verwandtschaft komplett vorlagen (Hall *et al.*, 1998) und zur Klasse der Mammalia zählen. Der Vergleich der in der Datenbank vorhandenen DNA-Sequenzen verschiedener Unterarten von *Sus scrofa* zeigt nur vier Sequenzunterschiede im gesamten *cytB*-Gen (Abbildung 25). Diese liegen nicht in dem von Meyer R. *et al.* (1995) beschriebenen

Abschnitt. Daher erfolgte eine Sequenzierung der DNA von verschiedenen Haus- und Wildschweinen in weiteren Bereichen des *cytB*-Gens.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1 C-BOS Taurus.TXT	atgactaaca	ttcgaaagtc	ccaccaccta	ataaaaattg	taaacaatgc	attcatcgac	cttcagagccc	catcaaacat	ttcatcatga	tgaatttttg
2 C-CAPREOLUS capreolus	atgaccaata	tcgaaaaaac	tcaccaccta	ataaaaattg	taaacaatgc	attcatcgat	cttcagagccc	catcaaacat	ttcatcatga	tgaacttttg
3 C-Mus Musculus.TXT	atgacaaaca	tacgaaaaac	acaccaccta	tttaaaaatta	taaaccactc	attcattgac	ctaccctgccc	catccaacat	ttcatcatga	tgaacttttg
4 C-Sus Scrofa domestica	ATGACCAACA	TCCGAAAATC	ACACCCACTA	ATAAAAATTA	TCAACAACGC	ATTCAATTGAC	CTCCAGAGCC	CCTCAAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG
5	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1 C-BOS Taurus.TXT	gttccctcct	gggaatctgc	ctaactctac	aaatctctac	aggcctattc	ctagcaaatc	actacacatc	cgacacaaca	acagcattct	cctctgttac
2 C-CAPREOLUS capreolus	gttctctatt	aggaatctgt	ctaactctac	aaatctctac	aggcctattc	ctagcaaatc	actacacatc	cgacacaaca	acagcattct	cctctgttac
3 C-Mus Musculus.TXT	gttccctcct	aggaatctgc	ctaactctac	aaatctctac	aggcctattc	ctagcaaatc	actacacatc	cgacacaaca	acagcattct	cctctgttac
4 C-Sus Scrofa domestica	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCTTAAC	AGGCTGTGTC	TTAGCAATAC	ATTACACATC	AGACACAACA	ACAGCTTTCCT	CATCAGTTAC
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1 C-BOS Taurus.TXT	ccatattctgc	cgagacgtga	actacggctg	aatcatccga	tacatacagc	caaacgggagc	ttcaatgttt	tttatctgct	tatatatgca	cgtaggagca
2 C-CAPREOLUS capreolus	tcacattctgc	cgagacgtga	actatggctg	aatcatccga	tatacatatg	caaacgggagc	atcaaatatt	tttatctgct	tattctctca	tgtaggagca
3 C-Mus Musculus.TXT	acacatttgt	cgagacgtga	attacgggtg	actaactcga	tatacatatg	caaacgggagc	ctcaaatatt	tttatctgct	tattctctca	tgtaggagca
4 C-Sus Scrofa domestica	ACACATTITGT	CGAGACGTAA	ATTACGGATG	AGTITATTGC	TATCTACTAG	CAAAACGGAGC	ATCCATATTC	TTTATTITGCC	TATTTCATCCA	CTAGGAGCGA
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1 C-BOS Taurus.TXT	ggcttatatt	acgggtctta	cacttttcta	gaacacatgaa	atatgtggagt	aatcctttctg	ctcacagtaa	tagccacagc	atttatagga	taogtctctc
2 C-CAPREOLUS capreolus	ggccttatact	atggatctta	cacttttcta	gaacacatgaa	acattgtggagt	aattcttcta	ttcacagtaa	tagccacagc	atttgtagga	taogtctctc
3 C-Mus Musculus.TXT	ggccttatact	atggatctta	cacttttcta	gaacacatgaa	acattgtggagt	acttcttactg	ttcgacagta	tagccacagc	atttatagga	taogtctctc
4 C-Sus Scrofa domestica	GGTCTTACT	ACGGATCTTA	TATATTCTTA	GAACATATGAA	ACATTGGAGT	AGTCTTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCTCTG
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
1 C-BOS Taurus.TXT	catgaggaca	aatatcattc	tgaggagcaa	cagtcacatc	caacctctta	tcagcaatcc	catacatcgg	cacaatttta	gtcgaatgaa	tctgaggggg
2 C-CAPREOLUS capreolus	catgaggaca	aatatcattc	tgaggagcaa	cagtcacatc	caacctctctc	tcagcaatcc	catatatcgg	tacaacccta	gttgaatgaa	tttgaggggg
3 C-Mus Musculus.TXT	catgaggaca	aatatcattc	tgaggagcaa	cagtcacatc	aaacctctta	tcagcaatcc	catatatcgg	aacaacccta	gtcgaatgaa	tttgaggggg
4 C-Sus Scrofa domestica	CCTGAGGACA	AATATCATTC	TGAGGAGCTA	CGGTATCATC	AAATCTACTA	TCAGCTATCC	CTTATATCGG	AACAGAGCTC	GTAGAAATGAA	TCTGAGGGGG
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
1 C-BOS Taurus.TXT	attctcagta	gacaaagcaa	cccttaccog	attcttgcct	ttccatttta	tccttccatt	tatcatcata	gcaattgcca	tagtccacct	actattctct
2 C-CAPREOLUS capreolus	cttttccagta	gacaaagcaa	cccttaccog	attcttgcct	ttccatttta	tccttccatt	tatcatcata	gcaattgcca	tagtccacct	actattctct
3 C-Mus Musculus.TXT	ctttcagta	gacaaagcaa	cccttaccog	attcttgcct	ttccatttta	tccttaccatt	tattatcgcc	gccttagcaa	tcgttccacct	cctcttctct
4 C-Sus Scrofa domestica	CTTTTCCTGC	GACAAAGCAA	CCCTTCACAG	ATTCTTCGCC	TTCCACTTTA	TCCTGCCATT	CATCATTTACC	GCCTTCGCAG	CCGTACATCT	CATATTCTCTG
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
1 C-BOS Taurus.TXT	cacgaacacg	gctccaacaa	cccaacagga	atttctctag	acgtagacaa	aatcccatc	cacccttact	ataccattaa	ggacattcta	ggggccctct
2 C-CAPREOLUS capreolus	cacgaacacg	gacaaagcaa	cccgatagga	atcccatcaa	acgggagcaa	aattccattt	cacccttact	ataccattaa	agatatcccta	ggagttctat
3 C-Mus Musculus.TXT	cacgaacacg	gacaaagcaa	cccaacagga	ttaaactcag	atgcagatgaa	aattccattt	cacccttact	ataccattaa	agatatcccta	ggatctctaa
4 C-Sus Scrofa domestica	CACGAAACCG	GATCCAACAA	CCCTTCACAG	ATTCTTCAGC	ACATAGACAA	AATTCATTTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
1 C-BOS Taurus.TXT	tactaattct	agctctaata	ctactagtag	tatttgcacc	cgacctctct	ggagaccagc	ataactacac	cccagccaat	ccactaaca	cacccctcta
2 C-CAPREOLUS capreolus	tactaattct	ttccctaata	ttactagtag	tatttgcacc	agacctgtct	ggagaccagc	ataactacac	accagccaat	ccactaaca	cacccctcta
3 C-Mus Musculus.TXT	tactattctt	aattctcata	accttagtag	tatttctccc	agacatacta	ggagaccagc	acaactacac	accagccaat	ccactaaca	cccccccca
4 C-Sus Scrofa domestica	TTATAATACT	AATCTACTA	ATCTTTGTAC	TATTTCTACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCAGCAAC	CCACTAACA	CCCCCCCCA
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
1 C-BOS Taurus.TXT	catcaaaccc	gagtgatatt	tcttatttgc	atacgcattc	ttaacatcaa	tcaccaacaa	actaggagga	gtactagccc	tagccttctc	tatcttaatt
2 C-CAPREOLUS capreolus	cattaaacca	gaatgatatt	tcttatttgc	atacgcattc	ctacgatcta	ttcctaacaa	actaggagga	gtactagccc	taactctc	aatcttaatt
3 C-Mus Musculus.TXT	tattaaacca	gaatgatatt	tcttatttgc	atacgcattc	ctacgcattc	tcaccaacaa	actaggagga	gtactagccc	taactctc	tatcttaatt
4 C-Sus Scrofa domestica	TATTAAACCA	GAATGATATT	TCTTATTTCG	CTACGCTATT	CTACGTTCAA	TTCTTAATAA	ACTAGGTGGA	GTGTGCGCC	TAGTAGCCTC	CATCTTAATT
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
1 C-BOS Taurus.TXT	cttgctctaa	tcaccttact	acacacctcc	aaacaacgaa	gcataaatatt	cggaccactc	agccaatgcc	tattctgagc	cctagtagca	gacctactga
2 C-CAPREOLUS capreolus	ttgactctta	tacctctctc	ccatacatct	aaacaacgaa	gcataaatatt	cggaccactc	agccaatgcc	tattctgagc	cctagtagct	gacctactga
3 C-Mus Musculus.TXT	ttgacctcta	tacctctctc	tcatactcta	aaacaacgaa	gcataaatatt	cggccaatc	acacaattt	tgtagtagct	cctagtagcc	aacctactaa
4 C-Sus Scrofa domestica	CTAATTTTAA	TGCCCATACT	GCACACATCC	AAACAACGAG	GCATAAATATT	TGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCAITTA
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
1 C-BOS Taurus.TXT	cactcacatg	aattggagga	caaccagtgc	aacaccccta	tatcaccatc	ggacaactag	catctgtctc	atactttctc	ctcatcttag	tgctaatacc
2 C-CAPREOLUS capreolus	cactaacatg	aattggagga	caaccagtgc	aacacccctt	catcgtctat	ggccaactag	catctattat	gtaatttctc	attattctag	tactcatacc
3 C-Mus Musculus.TXT	tcttaacctg	aattgggggc	caaccagtgc	aacaccccta	tattatcatc	ggccaactag	cctccatctc	atacttctta	atcatcttaa	ttctataacc
4 C-Sus Scrofa domestica	CTCAACATCG	AATTGGAGGA	CAACCGTAG	AACACCGGTT	CATCATCTC	GGCCAACCTAG	CTCCATCTTT	ATACTTCTTA	TCTTCTTAG	TATTGATACC
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
1 C-BOS Taurus.TXT	aacggcgggc	acaatcgaaa	acaaattact	aaaaatgaaga	c					
2 C-CAPREOLUS capreolus	aattacttagc	acaatcgaaa	ataacctctt	aaaaatgaaga						
3 C-Mus Musculus.TXT	aattctcagga	attatcgaga	acaaattact	aaaaattat	c					
4 C-Sus Scrofa domestica	AATCACTAGC	ATCATCGAAA	ACAACCTAAT	AAAATGAAGA						
5	*-----*	*-----*	*-----*	*-----*						

Abbildung 23: Sequenzvergleich des *cytB*-Gens zwischen Tieren verschiedener Ordnungen.

Markiert sind Sequenzbereiche, die in einer Folge von mindestens 20 Bp höchstens drei Sequenzunterschiede aufweisen.

ERGEBNISSE **CYTOCHROM B-GEN**

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1 C-H hoолоck. TXT	atgacccctc	tacgcaagac	caatcccctc	ataaaactaa	tcaatcattc	acttattgac	cttccagccc	catccaacat	ttccattgga	tgaacctttg
2 C-H lar. TXT	atgacccccc	tgcgcaaaac	taatccacta	ataaaactaa	tcacccactc	acttatcgac	cttccagccc	catccaacat	ttccattgga	tgaacctttg
3 C-H leucogenys. TXT	atgacccccc	tacgcaaaac	taacccacta	ataaaactaa	tcacccactc	acttattgac	cttccagccc	catccaacat	ttccattgga	tgaacctttg
4 C-H muelleri. TXT	atgacccccc	tacgcaaaac	caatccacta	ataaaactaa	tcacccactc	acttatcgac	cttccagccc	catccaacat	ttccattgga	tgaacctttg
5 C-H syndactylus. TXT	atgacccccc	tacgcaaaac	caacccacta	ataaaactaa	tcacccactc	acttatgatg	cttccagccc	catccaacat	ttccattgga	tgaacctttg
6 C-Hylobates gabriella	atgacccccc	tacgcaaaac	taacccacta	ataaaactaa	tcacccactc	acttattgac	cttccagccc	catccaacat	ttccattgga	tgaacctttg
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1 C-H hoолоck. TXT	gtctctctct	aggcactctg	ctaactctcc	aaatcattac	aggactattt	ctggccatgc	actacgcaac	agacgctctc	acagctttct	catcagtagc
2 C-H lar. TXT	gttccactct	aggcactctg	ctgactctcc	agatcattac	aggattattt	ttagccatgc	actacacacc	agatgctctc	acagctttct	catcagtagc
3 C-H leucogenys. TXT	gttccactct	aggcactctg	ctaactctcc	aaatcattac	agggttattt	ctggccatgc	actatacacc	agacgctctc	atagcctttc	catcagtagc
4 C-H muelleri. TXT	gttccactct	aggcactctg	ctgactctcc	agatcattac	aggattattt	ttagccatgc	actacacacc	agacgctctc	aaggctttct	catcagtagc
5 C-H syndactylus. TXT	gttccactct	aggcactctg	ctaactctcc	aaatcattac	aggactattt	ctagccatgc	actacacacc	agacgctctc	gacgctttct	catcagtagc
6 C-Hylobates gabriella	gttccactct	aggcactctg	ctaactctcc	aaatcattac	agggttattt	ctggccatgc	actatacacc	agacgctctc	atagcctttc	catcagtagc
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1 C-H hoолоck. TXT	ccacatcacc	cgagacgtga	actatgggtg	aattattcgc	cacottcaag	ccaaagggtg	ctcaatgttt	ttcatctgac	tatttctaca	catcgccgga
2 C-H lar. TXT	ccacatcacc	cgagacgtga	actatgggtg	actatcctgc	ccaaagggtg	ctcaatgttt	ttcatctgac	ttcatctgac	tatttctaca	catcgccgga
3 C-H leucogenys. TXT	ccacatcacc	cgagacgtga	actatgggtg	gggtattcgc	tacottcaag	ccaaagggtg	ctcaatgttt	ttcatctgac	tatttctaca	catcgccgga
4 C-H muelleri. TXT	ccacatcacc	cgagacgtga	actatgggtg	aattattcgc	cacottcaag	ccaaagggtg	ctcaatgttt	ttcatctgac	tatttctaca	catcgccgga
5 C-H syndactylus. TXT	ccacatcacc	cgagacgtga	actatgggtg	aattattcgc	tacottcaag	ccaaagggtg	ctcaatgttt	ttcatctgac	tatttctaca	catcgccgga
6 C-Hylobates gabriella	ccacatcacc	cgagacgtga	actatgggtg	gggtattcgc	tacottcaag	ccaaagggtg	ctcaatgttt	ttcatctgac	tatttctaca	catcgccgga
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1 C-H hoолоck. TXT	ggcctatact	acgggtcatt	ctctactcta	gagacgtgaa	acattgggtg	tatctctcta	ctcgcaacca	tagcaacagc	cttcatgggc	tacgtctctc
2 C-H lar. TXT	ggcctatact	acgggtcatt	ctctactcta	gagacgtgaa	acattgggtg	tatctctcta	ctcgcaacca	tagcaacagc	cttcatgggc	tacgtctctc
3 C-H leucogenys. TXT	ggcctatact	acgggtcatt	ctctactcta	gagacgtgaa	acattgggtg	tatctctcta	ctcgcaacca	tagcaacagc	cttcatgggc	tacgtctctc
4 C-H muelleri. TXT	ggcctatact	acgggtcatt	ctctactcta	gagacgtgaa	acattgggtg	tatctctcta	ctcgcaacca	tagcaacagc	cttcatgggc	tacgtctctc
5 C-H syndactylus. TXT	ggcctatact	acgggtcatt	ctctactcta	gagacgtgaa	acattgggtg	tatctctcta	ctcgcaacca	tagcaacagc	cttcatgggc	tacgtctctc
6 C-Hylobates gabriella	ggcctatact	acgggtcatt	ctctactcta	gagacgtgaa	acattgggtg	tatctctcta	ctcgcaacca	tagcaacagc	cttcatgggc	tacgtctctc
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
1 C-H hoолоck. TXT	catgaggcca	aatatccttc	tgaggggcca	cagtaataac	aaacactcta	tcgcgcgttc	catacatgga	aacagaccta	gtccaatgag	ctcgaggcgg
2 C-H lar. TXT	catgaggcca	aatatccttc	tgaggggcca	cagtaataac	aaacactcta	tcgcgcgttc	catacatgga	aacagaccta	gtccaatgag	ctcgaggcgg
3 C-H leucogenys. TXT	catgaggcca	aatatccttc	tgaggggcca	cagtaataac	aaacactcta	tcgcgcgttc	catacatgga	aacagaccta	gtccaatgag	ctcgaggcgg
4 C-H muelleri. TXT	catgaggcca	aatatccttc	tgaggggcca	cagtaataac	aaacactcta	tcgcgcgttc	catacatgga	aacagaccta	gtccaatgag	ctcgaggcgg
5 C-H syndactylus. TXT	catgaggcca	aatatccttc	tgaggggcca	cagtaataac	aaacactcta	tcgcgcgttc	catacatgga	aacagaccta	gtccaatgag	ctcgaggcgg
6 C-Hylobates gabriella	catgaggcca	aatatccttc	tgaggggcca	cagtaataac	aaacactcta	tcgcgcgttc	catacatgga	aacagaccta	gtccaatgag	ctcgaggcgg
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
1 C-H hoолоck. TXT	ctattcagtg	gacaaagcca	cactcacacg	tttcttccac	tttcaactta	tcttaccctt	catcatacga	acccctagga	ccctcacact	actattctta
2 C-H lar. TXT	ctattcagtg	gacaaagcca	cactcacacg	tttcttccac	tttcaactta	tcttaccctt	catcatacga	acccctagga	ccctcacact	actattctta
3 C-H leucogenys. TXT	ctattcagtg	gacaaagcca	cactcacacg	tttcttccac	tttcaactta	tcttaccctt	catcatacga	acccctagga	ccctcacact	actattctta
4 C-H muelleri. TXT	ctattcagtg	gacaaagcca	cactcacacg	tttcttccac	tttcaactta	tcttaccctt	catcatacga	acccctagga	ccctcacact	actattctta
5 C-H syndactylus. TXT	ctattcagtg	gacaaagcca	cactcacacg	tttcttccac	tttcaactta	tcttaccctt	catcatacga	acccctagga	ccctcacact	actattctta
6 C-Hylobates gabriella	ctattcagtg	gacaaagcca	cactcacacg	tttcttccac	tttcaactta	tcttaccctt	catcatacga	acccctagga	ccctcacact	actattctta
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
1 C-H hoолоck. TXT	cacgaaacag	gatcaaaaca	ccccctaggg	atctctctcc	aaccagacaa	aatcaccttt	cacccttact	acacaaatca	ggacatctta	ggactatttc
2 C-H lar. TXT	cacgaaacag	gatcaaaaca	ccccctaggg	atctctctcc	aaccagacaa	aatcaccttt	cacccttact	acacaaatca	ggacatctta	ggactatttc
3 C-H leucogenys. TXT	cacgaaacag	gatcaaaaca	ccccctaggg	atctctctcc	aaccagacaa	aatcaccttt	cacccttact	acacaaatca	ggacatctta	ggactatttc
4 C-H muelleri. TXT	cacgaaacag	gatcaaaaca	ccccctaggg	atctctctcc	aaccagacaa	aatcaccttt	cacccttact	acacaaatca	ggacatctta	ggactatttc
5 C-H syndactylus. TXT	cacgaaacag	gatcaaaaca	ccccctaggg	atctctctcc	aaccagacaa	aatcaccttt	cacccttact	acacaaatca	ggacatctta	ggactatttc
6 C-Hylobates gabriella	cacgaaacag	gatcaaaaca	ccccctaggg	atctctctcc	aaccagacaa	aatcaccttt	cacccttact	acacaaatca	ggacatctta	ggactatttc
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
1 C-H hoолоck. TXT	ttctctctct	catcctaata	agcctagtag	tatttcgccc	cgacccctta	ggcgaccagg	acaattatgt	ccaagctaac	cccttaaaaa	ccccctccca
2 C-H lar. TXT	ttctctctct	catcctaata	agcctagtag	tatttcgccc	cgacccctta	ggcgaccagg	acaattatgt	ccaagctaac	cccttaaaaa	ccccctccca
3 C-H leucogenys. TXT	ttctctctct	catcctaata	agcctagtag	tatttcgccc	cgacccctta	ggcgaccagg	acaattatgt	ccaagctaac	cccttaaaaa	ccccctccca
4 C-H muelleri. TXT	ttctctctct	catcctaata	agcctagtag	tatttcgccc	cgacccctta	ggcgaccagg	acaattatgt	ccaagctaac	cccttaaaaa	ccccctccca
5 C-H syndactylus. TXT	ttctctctct	catcctaata	agcctagtag	tatttcgccc	cgacccctta	ggcgaccagg	acaattatgt	ccaagctaac	cccttaaaaa	ccccctccca
6 C-Hylobates gabriella	ttctctctct	catcctaata	agcctagtag	tatttcgccc	cgacccctta	ggcgaccagg	acaattatgt	ccaagctaac	cccttaaaaa	ccccctccca
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
1 C-H hoолоck. TXT	cattaaaccc	gaatgatatt	ttttattcgc	atagcgaact	ctacgctcgc	tccttaataa	attaggagggt	gtactagccc	tcttattatc	aattctcatt
2 C-H lar. TXT	cattaaaccc	gaatgatatt	ttttattcgc	atagcgaact	ctacgctcgc	tccttaataa	attaggagggt	gtactagccc	tcttattatc	aattctcatt
3 C-H leucogenys. TXT	cattaaaccc	gaatgatatt	ttttattcgc	atagcgaact	ctacgctcgc	tccttaataa	attaggagggt	gtactagccc	tcttattatc	aattctcatt
4 C-H muelleri. TXT	cattaaaccc	gaatgatatt	ttttattcgc	atagcgaact	ctacgctcgc	tccttaataa	attaggagggt	gtactagccc	tcttattatc	aattctcatt
5 C-H syndactylus. TXT	cattaaaccc	gaatgatatt	ttttattcgc	atagcgaact	ctacgctcgc	tccttaataa	attaggagggt	gtactagccc	tcttattatc	aattctcatt
6 C-Hylobates gabriella	cattaaaccc	gaatgatatt	ttttattcgc	atagcgaact	ctacgctcgc	tccttaataa	attaggagggt	gtactagccc	tcttattatc	aattctcatt
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
1 C-H hoолоck. TXT	ctagtagcaa	ttctctacac	ccacgtagct	aaagcaacaa	gataatattt	togcccacta	agccaactca	cgtagtagct	cttagtaaca	gacttactga
2 C-H lar. TXT	ctagtagcaa	ttctctacac	ccacgtagct	aaagcaacaa	gataatattt	togcccacta	agccaactca	cgtagtagct	cttagtaaca	gacttactga
3 C-H leucogenys. TXT	ctagtagcaa	ttctctacac	ccacgtagct	aaagcaacaa	gataatattt	togcccacta	agccaactca	cgtagtagct	cttagtaaca	gacttactga
4 C-H muelleri. TXT	ctagtagcaa	ttctctacac	ccacgtagct	aaagcaacaa	gataatattt	togcccacta	agccaactca	cgtagtagct	cttagtaaca	gacttactga
5 C-H syndactylus. TXT	ctagtagcaa	ttctctacac	ccacgtagct	aaagcaacaa	gataatattt	togcccacta	agccaactca	cgtagtagct	cttagtaaca	gacttactga
6 C-Hylobates gabriella	ctagtagcaa	ttctctacac	ccacgtagct	aaagcaacaa	gataatattt	togcccacta	agccaactca	cgtagtagct	cttagtaaca	gacttactga
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
1 C-H hoолоck. TXT	ctctcacatg	aatcgaggga	cagccagtgga	gctatccatt	catcacattc	ggacaagtga	catccgtact	atacttcacc	acaatcttaa	tctctatacc
2 C-H lar. TXT	ctctcacatg	aatcgaggga	cagccagtgga	gctatccatt	catcacattc	ggacaagtga	catccgtact	atacttcacc	acaatcttaa	tctctatacc
3 C-H leucogenys. TXT	ctctcacatg	aatcgaggga	cagccagtgga	gctatccatt	catcacattc	ggacaagtga	catccgtact	atacttcacc	acaatcttaa	tctctatacc
4 C-H muelleri. TXT	ctctcacatg	aatcgaggga	cagccagtgga	gctatccatt	catcacattc	ggacaagtga	catccgtact	atacttcacc	acaatcttaa	tctctatacc
5 C-H syndactylus. TXT	ctctcacatg	aatcgaggga	cagccagtgga	gctatccatt	catcacattc	ggacaagtga	catccgtact	atacttcacc	acaatcttaa	tctctatacc
6 C-Hylobates gabriella	ctctcacatg	aatcgaggga	cagccagtgga	gctatccatt	catcacattc	ggacaagtga	catccgtact	atacttcacc	acaatcttaa	tctctatacc
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
1 C-H hoолоck. TXT	aatcgccctc	ttaatcgaaa	acaaaatact	caaatgaacc	t					
2 C-H lar. TXT	agccgcctcc	ctaattcgaaa	acaaaatact	caaatgaacc	t					
3 C-H leucogenys. TXT	aacagccctc	ttaatcgaaa	acaaaatact	caaatgaacc	t					
4 C-H muelleri. TXT	ggccgcctcc	ctaattcgaaa	acaaaatact	caaatgaacc	t					
5 C-H syndactylus. TXT	aatcgccctc	ctaattcgaaa	acaaaatact	caaatgaacc	t					
6 C-Hylobates gabriella	aacagccctc	ttaatcgaaa	acaaaatact	caaatgaacc	t					
7	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*

Abbildung 24: Sequenzvergleich des *cytB*-Gens zwischen verschiedenen Arten einer Gattung (*Hylobates*). Markiert sind Bereiche, die in einem mindestens 20 Bp langen Sequenzabschnitt höchstens drei Sequenzheterogenitäten aufweisen.

ERGEBNISSE
CYTOCHROM B-GEN

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1 C-Sus scrofa asian.TX	atgaccaaca	tccgaataac	acacccacta	ataaaaatta	tcaacaacgc	attcattgac	ctcccagccc	cctcaaacat	ctcatcatga	tgaactctcg
2 C-Sus Scrofa domestic	ATGACCAACA	TOCGAAAATC	ACACCCACTA	ATAAAAATTA	TCAACAACGC	ATTCAATTGAC	CTCCCAGCCC	CCTCAAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG
3 C-Sus scrofa meri.TXT	ATGACCAACA	TOCGAAAATC	ACACCCACTA	ATAAAAATTA	TCAACAACGC	ATTCAATTGAC	CTCCCAGCCC	CCTCAAAACAT	CTCATCATGA	TGAAACTTCG
4										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1 C-Sus scrofa asian.TX	gttccctctt	aggcatctgc	ctaactcttg	saatcctaac	aggcctgttc	ttagcaaatc	attacacatc	agacacaaca	acagctttct	catcagttac
2 C-Sus Scrofa domestic	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTC	TTAGCAAAATC	ATTACACATC	AGACACAACA	ACAGCTTTCT	CATCAGTTAC
3 C-Sus scrofa meri.TXT	GTTCCTCTTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTC	TTAGCAAAATC	ATTACACATC	AGACACAACA	ACAGCTTTCT	CATCAGTTAC
4										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1 C-Sus scrofa asian.TX	acacatttgt	cgagacgtaa	attacgggat	agttattcgc	tatctacatg	caaacgggagc	atccatattc	tttatttggc	tattcatcca	cgtagggcga
2 C-Sus Scrofa domestic	ACACATTGTG	CGAGACGTAA	ATTACGGGAT	AGTTATTTCG	TATCTACATG	CAAAACGGAGC	ATCCATATTTC	TTTATTTTGCC	TATTTCATCCA	CGTAGGCCGA
3 C-Sus scrofa meri.TXT	ACACATTGTG	CGAGACGTAA	ATTACGGGAT	AGTTATTTCG	TATCTACATG	CAAAACGGAGC	ATCCATATTTC	TTTATTTTGCC	TATTTCATCCA	CGTAGGCCGA
4										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1 C-Sus scrofa asian.TX	gggtctatact	acggatccta	tatatctcta	gaacacatgaa	acattggagt	agtcctacta	tttaccggtta	tagcaaacgc	cttcataggc	tacgtccctgc
2 C-Sus Scrofa domestic	GGTCTATACT	ACGGATCCTA	TATATTCTTA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGGTTA	TAGCAAACGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC
3 C-Sus scrofa meri.TXT	GGTCTATACT	ACGGATCCTA	TATATTCTTA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGGTTA	TAGCAAACGC	CTTCATAGGC	TACGTCCTGC
4										
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
1 C-Sus scrofa asian.TX	cctgaggaca	aatatcattc	tgaggagcta	cgttcacac	saatctacta	tcagctatcc	cttatatcgg	aacagacccc	gtagaatgaa	cttgaggggg
2 C-Sus Scrofa domestic	CCTGAGGACA	AATATCAITTC	TGAGGAGCTA	CGGTCACTAC	AAATCTACTA	TCAGCTATCC	CTTATATCGG	AACAGACCTC	GTAGAATGAA	TCTGAGGGGG
3 C-Sus scrofa meri.TXT	CCTGAGGACA	AATATCAITTC	TGAGGAGCTA	CGGTCACTAC	AAATCTACTA	TCAGCTATCC	CTTATATCGG	AACAGACCTC	GTAGAATGAA	TCTGAGGGGG
4										
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
1 C-Sus scrofa asian.TX	cttttccgtc	gacaaagcaa	ccttcacagc	attctctggc	ttccacttta	tcctgcattt	catcattacc	gccctgcgag	cgttacatct	cctatttccg
2 C-Sus Scrofa domestic	CTTTTCGGTC	GACAAAGCAA	COCTCACAGC	ATTCTTGGCC	TTCCACTTTA	TCTTGCCATT	CATCAITTACC	GCCCTGCGAG	CGGTACATCT	CATATTCCCTG
3 C-Sus scrofa meri.TXT	CTTTTCGGTC	GACAAAGCAA	COCTCACAGC	ATTCTTGGCC	TTCCACTTTA	TCTTGCCATT	CATCAITTACC	GCCCTGCGAG	CGGTACATCT	CATATTCCCTG
4										
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
1 C-Sus scrofa asian.TX	cacgaacacg	gatccaacaa	ccttacccga	atctcatcag	acatagacaa	saattccattt	cacccatact	acactattaa	agacattcta	ggagcccttat
2 C-Sus Scrofa domestic	CACGAACACG	GATCCAACAA	COCTACCCGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AAITTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCCTTAT
3 C-Sus scrofa meri.TXT	CACGAACACG	GATCCAACAA	COCTACCCGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AAITTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCCTTAT
4										
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
1 C-Sus scrofa asian.TX	ttataataact	aatcctacta	atccttgtag	tattctcacc	agacctacta	ggagaccagc	acaactacac	cccagcaaac	ccactaaaca	ccccacccca
2 C-Sus Scrofa domestic	TTATAATACT	AATCCTACTA	ATCCTTGTAG	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCAGCAAAC	CCACTAAACA	CCCCACCCCA
3 C-Sus scrofa meri.TXT	TTATAATACT	AATCCTACTA	ATCCTTGTAG	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCAGCAAAC	CCACTAAACA	CCCCACCCCA
4										
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
1 C-Sus scrofa asian.TX	tattaaacca	gaatgatatt	tcttattcgc	ctacgctatt	ctacgttcaa	ttcctaataa	actagggtga	gtgttggccc	tagtagccct	catcctaata
2 C-Sus Scrofa domestic	TAITTAACCA	GAATGATATT	TCTTATTTCG	CTACGCTATT	CTACGTTCAA	TTCTTAATAA	ACTAGGTGGA	GTGTGCGCCC	TAGTAGCCCT	CATCCTTAATC
3 C-Sus scrofa meri.TXT	TAITTAACCA	GAATGATATT	TCTTATTTCG	CTACGCTATT	CTACGTTCAA	TTCTTAATAA	ACTAGGTGGA	GTGTGCGCCC	TAGTAGCCCT	CATCCTTAATC
4										
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
1 C-Sus scrofa asian.TX	ctaattttta	tgcccatact	acacacatcc	saacacacgaa	gcataaatatt	tcgaccacta	agtcactgcc	tattctgaat	actagttaga	gacctcatta
2 C-Sus Scrofa domestic	CTAATTTTAA	TGCCCATACT	GCACACATCC	AAACAACGAG	GCATAAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATT
3 C-Sus scrofa meri.TXT	CTAATTTTAA	TGCCCATACT	GCACACATCC	AAACAACGAG	GCATAAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATT
4										
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
1 C-Sus scrofa asian.TX	cactaacatg	aattggagga	caaccogtag	saaccccggt	catcatcatc	ggccaactag	cctccatctt	atacttccca	atcattctag	tattgatacc
2 C-Sus Scrofa domestic	CACTAACATG	AATTGGAGGA	CAACCCGTAG	AACACCCGTT	CATCATCATC	GGCCAACCTAG	CCTCCATCTT	ATACTTCCCTA	ATCATCTTAG	TATTGATACC
3 C-Sus scrofa meri.TXT	CACTAACATG	AATTGGAGGA	CAACCCGTAG	AACACCCGTT	CATCATCATC	GGCCAACCTAG	CCTCCATCTT	ATACTTCCCTA	ATCATCTTAG	TATTGATACC
4										
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
1 C-Sus scrofa asian.TX	aatcactagc	atcatcgaaa	acaacctatt	aaaatgaaga						
2 C-Sus Scrofa domestic	AATCACTAGC	ATCATCGAAA	ACAACCTATT	AAAATGAAGA						
3 C-Sus scrofa meri.TXT	AATCACTAGC	ATCATCGAAA	ACAACCTATT	AAAATGAAGA						
4										

Abbildung 25: Sequenzvergleich des *cytB*-Gens zwischen Tieren verschiedener Unterarten von *Sus scrofa*.
Die vier in diesem Sequenzabschnitt zwischen den drei Unterarten vorhandenen Unterschiede sind mit einem Pfeil markiert.

Die für die Amplifikation des *cytB*-Gens notwendigen Primer wurden anhand der Sequenzvergleiche platziert. Sie wurden so in die Bereiche mit wenigen Sequenzunterschieden zwischen den Arten gelegt, dass Amplifikate mit einer Größe von 100-400 Basen

entstehen. Es wurde darauf geachtet, dass Primerbindungsstellen nicht in den Abschnitten mit Sequenzunterschieden zwischen den Unterarten von *Sus scrofa* liegen. Die Lage der Primer, die mit der Software Primer Express der Firma ABI entwickelt wurden und für die DNA-Amplifikation verschiedener Spezies geeignet sind, ist in Abbildung 26 aufgeführt. Durch die Amplifikation ist es möglich, 963 Bp des 1151 Bp langen Gens zu amplifizieren. In die 5'- bzw. 3'-Bereiche des Gens konnten die Primer aufgrund ungünstiger Sequenzen nicht gelegt werden (Software-Berechnung).

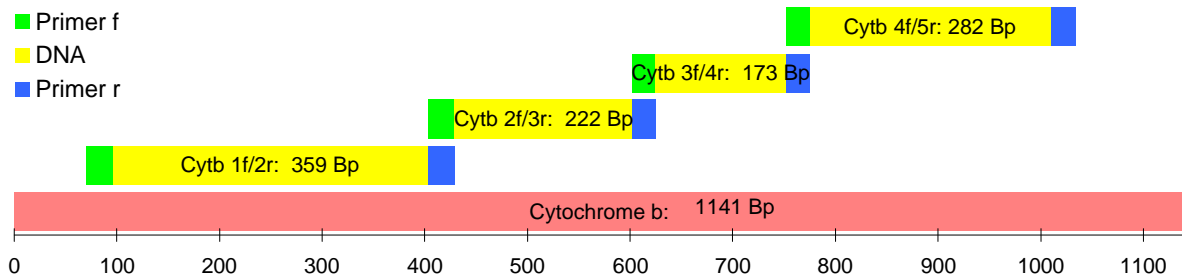


Abbildung 26: Lage und Größe der Amplifikate im *cytB*-Gen.

Mit den vorhandenen Primern konnten 963 Bp des 1141 Bp großen *cytB*-Gens amplifiziert werden.

Die amplifizierten DNA-Bereiche einiger Haus- und Wildschweinproben wurden im ABI-Prism™ Sequenzer analysiert. Alle untersuchten Proben im zweiten (Abbildung 27) und dritten (Abbildung 28) amplifizierten *cytB*-Abschnitt waren sequenzgleich. Der vierte Abschnitt (Abbildung 29) wies als einzigen Sequenzunterschied eine Basensubstitution zwischen Hausschwein 1 und den anderen Haus- und Wildschweinen auf.

ERGEBNISSE
CYTOCHROM B-GEN

	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Cytb2f3r-01		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-08		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-09		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-11		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-13		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-17		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-22		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-23		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-25		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-30		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-37		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-47		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
Cytb2f3r-48		TGA	GGACAAATAT	CATTCCTGAGG	GGCTACGGTC	ATCACAAATC	TACTATCAGC	TATCCCTTAT	ATCGGAACAG
	510	520	530	540	550	560	570	580	590
Cytb2f3r-01	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-08	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-09	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-11	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-13	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-17	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-22	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-23	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-25	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-30	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-37	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-47	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
Cytb2f3r-48	ACCTCGTAGA	ATGAATCTGA	GGGGGCTTTT	CCGTCGACAA	AGCAACCCCTC	ACACGATTCT	TGCGCTTCCA	CTTTATCCCTG	CCATTTCATCA
	600	610	620	630	640	650	660	670	680
Cytb2f3r-01	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-08	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-09	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-11	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-13	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-17	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-22	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-23	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-25	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-30	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-37	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-47	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			
Cytb2f3r-48	TTACCGCCCT	CGCAGCCGTA	CATCTCCTAT	TCCTGACAGA	AACCGGATCC	AACAACCC			

Abbildung 27: Sequenzvergleich des Cytb 2f/3r-Abschnitts zwischen Haus- und Wildschweinen.
Die Sequenzen aller untersuchten Individuen waren in diesem Abschnitt identisch.

	630	640	650	660	670	680	690	700	710
Cytb3f4r-1	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
Cytb3f4r-124	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
<i>Fergl. HS</i>									
Cytb3f4r-6	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
Cytb3f4r-7	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
Cytb3f4r-9	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
Cytb3f4r-11	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
Cytb3f4r-12	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
Cytb3f4r-13	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
Cytb3f4r-17	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
<i>Fergl. HS</i>									
<i>Cons. HS</i>	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
<i>Cons. HS</i>	--CTACCGGA	ATCTCATCAG	ACATAGACAA	AATTCATTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT
<i>Fergl. HS-HS</i>									
	720	730	740	750	760	770	780	790	800
Cytb3f4r-1	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
Cytb3f4r-124	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
<i>Fergl. HS</i>									
Cytb3f4r-6	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
Cytb3f4r-7	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
Cytb3f4r-9	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
Cytb3f4r-11	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
Cytb3f4r-12	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
Cytb3f4r-13	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
Cytb3f4r-17	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
<i>Fergl. HS</i>									
<i>Cons. HS</i>	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
<i>Cons. HS</i>	AATCCTACTA	ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCA		
<i>Fergl. HS-HS</i>									

Abbildung 28: Sequenzvergleich des Cytb 3f/4r-Abschnitts zwischen Haus- und Wildschweinen.
Die Sequenzen aller untersuchten Individuen waren in diesem Abschnitt identisch.

ERGEBNISSE

CYTOCHROM B-GEN

[illegible]

↪ Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite

ERGEBNISSE
CYTOCHROM B-GEN

	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010
Cytb4f5r-1	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-124	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-125	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-126	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cytb4f5r-6	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-7	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-9	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-11	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-12	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-13	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-17	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-21	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-23	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-25	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-30	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-34	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-37	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-47	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-48	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-61	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-67	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
Cytb4f5r-70	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
<i>Cons. WS</i>	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA	AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
Cytb4f5r-1	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-124	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-125	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-126	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cytb4f5r-6	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-7	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-9	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-11	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-12	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-13	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-17	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-21	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-23	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-25	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-30	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-34	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-37	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-47	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-48	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-61	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-67	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
Cytb4f5r-70	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
<i>Cons. WS</i>	AATTGGAGGA	CAACCCCTGAG	AA						
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 29: Sequenzvergleich des Cytb 4f/5r-Abschnitts zwischen Haus- und Wildschweinen.

Hausschwein Probe 1 weist an Position 855 des *cytB*-Gens eine von allen anderen Haus- und Wildschweinen unterschiedliche Sequenz auf. Bis auf diese Position sind alle Sequenzen der untersuchten Individuen in diesem Abschnitt identisch.

Alle im sequenzierten Abschnitt des *cytB*-Gens vorkommenden DNA-Sequenzunterschiede und die durch die Codons codierte Aminosäuren sind in der Tabelle 28 aufgeführt. Eine Änderung der Aminosäure-Sequenz tritt nur an einer Position bei Variante 5 auf. Insgesamt konnten fünf Sequenzvarianten des *cytB*-Gens identifiziert werden.

In Tabelle 29 sind die Sequenzvarianten den sequenzierten Proben zugeordnet. Nur die Wildschweine der Variante 4 sind durch einen *HinfI*-Schnitt von den anderen Proben differenzierbar. Die Varianten unterscheiden sich um ein bis zwei Basenpaare im sequenzierten Bereich voneinander. Für die sequenzierten Wildschweine konnten vier verschiedene Genotypen in dem sequenziert *cytB*-Abschnitt festgestellt werden, wobei jeweils mehrere Wildschweine die gleiche Variante auswiesen. Lediglich die Probe Nr. 5 unterscheidet sich an mindestens 5 Positionen von den DNA-Sequenzen der anderen Tiere.

Tabelle 28: Auswirkungen der DNA-Sequenzunterschiede auf die Triplet-codierte Aminosäure-Sequenz.

Dargestellt sind Codons, die im *cytB*-Gen bei verschiedenen Proben Unterschiede im Vergleich zu Variante 1 aufweisen. Das Nukleotid an Position 235 des *cytB*-Gens liegt an der ersten Position des Triplets. Dieses Codon codiert bei Variante 5 für die Aminosäure Isoleucin, bei allen anderen für Valin. Die weiteren Basenaustausche führen zu keiner Änderung der Aminosäure-Sequenz.

Position	127	207	234	235	243	267	303	354	855
Variante 1	TTG	ATT	GTT	ATT	TAT	ATA	GGT	GTC	CCC
	Leucin	Isoleucin	Valin	Isoleucin	Tyrosin	Isoleucin	Glycin	Valin	Prolin
Variante 2	-	-	-	-	-	-	-	-	CCT
									Prolin
Variante 3	CTG	-	-	-	-	-	-	-	CCT
	Leucin								Prolin
Variante 4	-	-	GTC	-	-	-	-	-	CCT
			Valin						Prolin
Variante 5	-	-	-	GTT	-	-	-	-	CCT
				Valin					Prolin
Variante 6	-	ATC	-	-	TAC	ATG	GGC	GTT	CCT
		Isoleucin			Tyrosin	Isoleucin	Glycin	Valin	Prolin

Tabelle 29: Zuordnung verschiedener Proben zu den vorkommenden Sequenzvarianten.

Jeweils mehrere Wildschweine weisen eine der vier bei Wildschweinen festgestellte Variante der DNA-Sequenz des *cytB*-Gens auf.

Variante	1	2	3	4	5	6
Proben	1	11, 13, 15, 16	7, 17, 30, 31	8, 9, 10	12, 64, 65, 69	5

In Abbildung 30 ist die DNA-Sequenz der vier Amplifikate von Probe 1 dargestellt und in der Sequenz "Variante 1" zusammengefasst. Bei den anderen vorkommenden Sequenzvarianten sind nur die von Variante 1 abweichenden Nukleotide aufgeführt. Von den sequenzierten Hausschweinproben gibt es bei Probe 5 Abweichungen an Position 208, 243, 267, 303 und 354, während Probe 1 an Position 855 von allen anderen Individuen abweicht. Die Unterschiede zwischen den Wildschweinen und zwischen Wild- und Hausschweinen liegen im vorderen Teil des *cytB*-Gens an Position 127, 234 und 235.

ERGEBNISSE
CYTOCHROM B-GEN

		10	20	30	40	50	60	70	80
C-Sus Scrofa dom	ATGACCAACA	TCCGAAAATC	ACACCCACTA	ATAAAAAATTA	TCAACAACGC	ATTTCATTGAC	CTCCCAGCCC	CCTCAAAACAT	
Cytb12-cons								C	CCTCAAAACAT
Cytb23-cons									==>
Cytb34-cons									==>
Cytb45-cons									==>
Variante 1	ATGACCAACA	TCCGAAAATC	ACACCCACTA	ATAAAAAATTA	TCAACAACGC	ATTTCATTGAC	CTCCCAGCCC	CCTCAAAACAT	
Variante 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		90	100	110	120	130	140	150	160
C-Sus Scrofa dom	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCCTCTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT	TTAGCAATAC	
Cytb12-cons	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCCTCTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT	TTAGCAATAC	
Cytb23-cons									==>
Cytb34-cons									==>
Cytb45-cons									==>
Variante 1	CTCATCATGA	TGAAACTTCG	GTTCCCTCTT	AGGCATCTGC	CTAATCTTGC	AAATCCTAAC	AGGCCTGTTT	TTAGCAATAC	
Variante 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 3	-----	-----	-----	-----	-----C-----	-----	-----	-----	
Variante 4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		170	180	190	200	210	220	230	240
C-Sus Scrofa dom	ATTACACATC	AGACACAACA	ACAGCTTTCT	CATCAGTTAC	ACACATTTGT	CGAGACGTAA	ATTACGGATG	AGTTATTTCGC	
Cytb12-cons	ATTACACATC	AGACACAACA	ACAGCTTTCT	CATCAGTTAC	ACACATTTGT	CGAGACGTAA	ATTACGGATG	AGTTATTTCGC	
Cytb23-cons									==>
Cytb34-cons									==>
Cytb45-cons									==>
Variante 1	ATTACACATC	AGACACAACA	ACAGCTTTCT	CATCAGTTAC	ACACATTTGT	CGAGACGTAA	ATTACGGATG	AGTTATTTCGC	
Variante 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-----	
Variante 5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----G-----	
Variante 6	-----	-----	-----	-----	-----C-----	-----	-----	-----	
		250	260	270	280	290	300	310	320
C-Sus Scrofa dom	TATCTACATG	CAAACGGAGC	ATCCATATTC	TTTATTTGCC	TATTCATCCA	CGTAGGCCGA	GGTCTATACT	ACGGATCCTA	
Cytb12-cons	TATCTACATG	CAAACGGAGC	ATCCATATTC	TTTATTTGCC	TATTCATCCA	CGTAGGCCGA	GGTCTATACT	ACGGATCCTA	
Cytb23-cons									==>
Cytb34-cons									==>
Cytb45-cons									==>
Variante 1	TATCTACATG	CAAACGGAGC	ATCCATATTC	TTTATTTGCC	TATTCATCCA	CGTAGGCCGA	GGTCTATACT	ACGGATCCTA	
Variante 2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Variante 6	--C-----	-----	-----G-----	-----	-----	-----	--C-----	-----	

↪ Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite

ERGEBNISSE
CYTOCHROM B-GEN

		330	340	350	360	370	380	390	400
C-Sus Scrofa dom		TATATTCTTA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCTCTG
Cytb12-cons		TATATTCTTA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCTCTG
Cytb23-cons									==>
Cytb34-cons									==>
Cytb45-cons									==>
Variante 1		TATATTCTTA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	AGTCCTACTA	TTTACCGTTA	TAGCAACAGC	CTTCATAGGC	TACGTCTCTG
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----T-----	-----	-----	-----	-----
		410	420	430	440	450	460	470	480
C-Sus Scrofa dom		CCTGAGGACA	AATATCATTC	TGAGGAGCTA	CGGTCATCAC	AAATCTACTA	TCAGCTATCC	CTTATATCGG	AACAGACCTC
Cytb12-cons		CCTGAGGACA	AATATCATTC	TGAGGAGCTA	CGGTCATCAC	AAATCTACTA	TCAGCTATCC	CTTATATCGG	AACAGACCTC
Cytb23-cons				CTA	CGGTCATCAC	AAATCTACTA	TCAGCTATCC	CTTATATCGG	AACAGACCTC
Cytb34-cons									==>
Cytb45-cons									==>
Variante 1		CCTGAGGACA	AATATCATTC	TGAGGAGCTA	CGGTCATCAC	AAATCTACTA	TCAGCTATCC	CTTATATCGG	AACAGACCTC
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		490	500	510	520	530	540	550	560
C-Sus Scrofa dom		GTAGAATGAA	TCTGAGGGGG	CTTTTCGGTC	GACAAAGCAA	CCCTCACACG	ATTCTTCGCC	TTCCACTTTA	TCCTGCCAAT
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		GTAGAATGAA	TCTGAGGGGG	CTTTTCGGTC	GACAAAGCAA	CCCTCACACG	ATTCTTCGCC	TTCCACTTTA	TCCTGCCAAT
Cytb34-cons									==>
Cytb45-cons									==>
Variante 1		GTAGAATGAA	TCTGAGGGGG	CTTTTCGGTC	GACAAAGCAA	CCCTCACACG	ATTCTTCGCC	TTCCACTTTA	TCCTGCCAAT
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		570	580	590	600	610	620	630	640
C-Sus Scrofa dom		CATCAATTACC	GCCCTCGCAG	CCGTACATCT	CCTATTCTCTG	CACGAAACCG	GATCCAACAA	CCCTACCGGA	ATCTCATCAG
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		CATCAATTACC	GCCCTCGCAG	CCGTACATCT	CCTATTCTCTG	CACGAAACCG	GATCCAACAA	CCC	
Cytb34-cons							CTACCGGA	ATCTCATCAG	
Cytb45-cons								==>	
Variante 1		CATCAATTACC	GCCCTCGCAG	CCGTACATCT	CCTATTCTCTG	CACGAAACCG	GATCCAACAA	CCCTACCGGA	ATCTCATCAG
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		650	660	670	680	690	700	710	720
C-Sus Scrofa dom		ACATAGACAA	AATTCATTTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT	AATCCTACTA
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		<==							
Cytb34-cons		ACATAGACAA	AATTCATTTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT	AATCCTACTA
Cytb45-cons									==>
Variante 1		ACATAGACAA	AATTCATTTT	CACCCATACT	ACACTATTAA	AGACATTCTA	GGAGCCTTAT	TTATAATACT	AATCCTACTA
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		730	740	750	760	770	780	790	800
C-Sus Scrofa dom		ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCAGCAAAC	CCACTAAACA	CCCCACCCCA
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		<==							
Cytb34-cons		ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCAGCAAAC	CCACTAAACA	CCCCACCCCA
Cytb45-cons				TA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCAGCAAAC	CCACTAAACA	CCCCACCCCA
Variante 1		ATCCTTGTAC	TATTCTCACC	AGACCTACTA	GGAGACCCAG	ACAACCTACAC	CCCAGCAAAC	CCACTAAACA	CCCCACCCCA
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		810	820	830	840	850	860	870	880
C-Sus Scrofa dom		TATTAAACCA	GAATGATATT	TCTTATTCGC	CTACGCTATT	CTACGTTCAA	TTCCCTAATAA	ACTAGGTGGA	GTGTTGGCCC
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		<==							
Cytb34-cons		<==							
Cytb45-cons		TATTAAACCA	GAATGATATT	TCTTATTCGC	CTACGCTATT	CTACGTTCAA	TTCCCTAATAA	ACTAGGTGGA	GTGTTGGCCC
Variante 1		TATTAAACCA	GAATGATATT	TCTTATTCGC	CTACGCTATT	CTACGTTCAA	TTCCCTAATAA	ACTAGGTGGA	GTGTTGGCCC
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----T-----	-----	-----

↳ Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite

ERGEBNISSE
CYTOCHROM B-GEN

		890	900	910	920	930	940	950	960
C-Sus Scrofa dom		TAGTAGCCTC	CATCCTAATC	CTAATTTTAA	TGCCCATACT	GCACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		<==							
Cytb34-cons		<==							
Cytb45-cons		TAGTAGCCTC	CATCCTAATC	CTAATTTTAA	TGCCCATACT	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA
Variante 1		TAGTAGCCTC	CATCCTAATC	CTAATTTTAA	TGCCCATACT	ACACACATCC	AAACAACGAG	GCATAATATT	TCGACCACTA
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

		970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
C-Sus Scrofa dom		AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG	AATTGGAGGA	CAACCCGTAG	AACACCCGTT
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		<==							
Cytb34-cons		<==							
Cytb45-cons		AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG	AATTGGAGGA	CAACCCGTAG	AA
Variante 1		AGTCAATGCC	TATTCTGAAT	ACTAGTAGCA	GACCTCATTA	CACTAACATG	AATTGGAGGA	CAACCCGTAG	AACACCCGTT
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

		1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
C-Sus Scrofa dom		CATCATCATC	GGCCAACTAG	CCTCCATCTT	ATACTTCCTA	ATCATTTCTAG	TATTGATACC	AATCACTAGC	ATCATCGAAA
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		<==							
Cytb34-cons		<==							
Cytb45-cons		<==							
Variante 1		CATCATCATC	GGCCAACTAG	CCTCCATCTT	ATACTTCCTA	ATCATTTCTAG	TATTGATACC	AATCACTAGC	ATCATCGAAA
Variante 2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 3		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Variante 6		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

		1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
C-Sus Scrofa dom		ACAACCTATT	AAAATGAAGA						
Cytb12-cons		<==							
Cytb23-cons		<==							
Cytb34-cons		<==							
Cytb45-cons		<==							
Variante 1		ACAACCTATT	AAAATGAAGA						
Variante 2		-----	-----						
Variante 3		-----	-----						
Variante 4		-----	-----						
Variante 5		-----	-----						
Variante 6		-----	-----						

Abbildung 30: Sequenz des *cytB*-Gens von Wild- und Hausschweinen mit den aufgetretenen Varianten.
Die Überlappung der vier Amplifikate von Probe 1 sind in der Sequenz "Variante 1" zusammengefasst. Bei den anderen vorkommenden Sequenzvarianten sind nur die von Variante 1 abweichenden Nukleotide aufgeführt.

3 MELANOCORTIN-1-REZEPTOR-GEN

3.1 Primerdesign

In der GenBank (Benson *et al.*, 2000) war nur die DNA-Sequenz des Melanocortin-1-Rezeptor-Gens (*mc1r*-Gen) eines Hausschweins veröffentlicht. Es bestand daher keine Möglichkeit, die DNA-Sequenz verschiedener Individuen der Spezies zu vergleichen, um variablere und konserviertere Regionen vorab zu identifizieren. Die angrenzenden DNA-Sequenzabschnitte waren nicht bekannt. Mit der Software Primer Express von ABI wurden die optimalen Primer-Anlagerungspositionen bestimmt. Durch drei sich überlappende Amplifikationsabschnitte konnten 662 Bp des 758 Bp großen Gens sequenziert werden (Abbildung 31). Das Amplifikat MC 1f/3r überlappt 89 Bp mit dem Amplifikat 2f/5r und dieses überlappt 94 Bp mit dem Amplifikat 4f/6r.

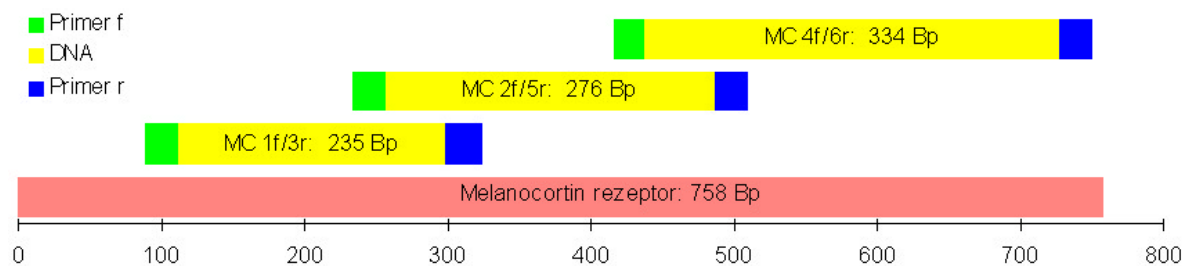


Abbildung 31: Primer zur Amplifikation des *mc1r*-Gens.

Sechs Primer führen zu drei sich überlappenden Amplifikationsabschnitten, die 662 Bp des 758 Bp großen Gens abdecken.

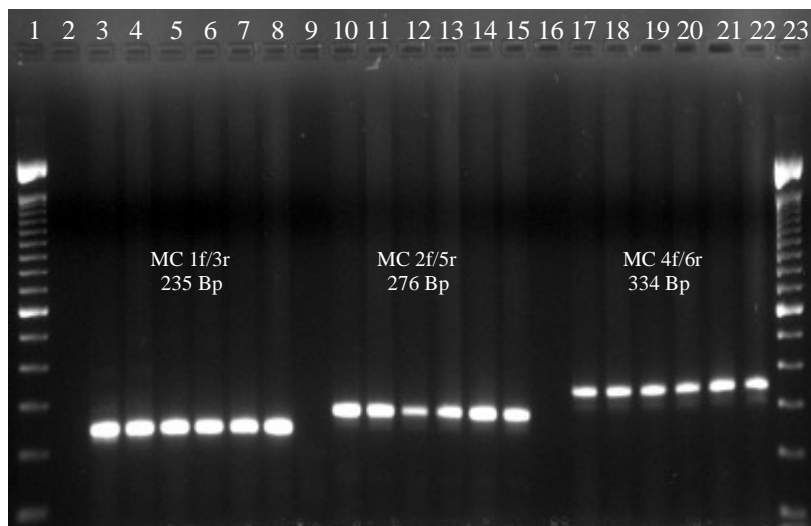


Abbildung 32: Amplifikation des *mc1r*-Gens mit den MC-Primern bei verschiedenen Annealingtemperaturen (T_A).

Die DNA der extrahierten Haus- und Wildschwein-DNA ist bei allen Temperaturen von allen Primerpaaren gut amplifiziert worden.

Nr.	Probe	ID	T _A (°C)	Primer
1	100 Bp-Marker			
2	Wasser		60,3	MC1f/3r
3	1	HS	55,1	
4		WS	55,1	
5	1	HS	60,3	
6		WS	60,3	
7	1	HS	64,8	MC2f/5r
8		WS	64,8	
9	Wasser		60,3	
10	1	HS	55,1	
11		WS	55,1	
12	1	HS	60,3	MC4f/6r
13		WS	60,3	
14	1	HS	64,8	
15		WS	64,8	
16	Wasser		60,3	
17	1	HS	55,1	MC4f/6r
18		WS	55,1	
19	1	HS	60,3	
20		WS	60,3	
21	1	HS	64,8	
22		WS	64,8	
23	100 Bp-Marker			

Die Abbildung 32 zeigt die Amplifikate der Primer aus Abbildung 31 bei Optimierung der PCR. Alle Amplifikate erscheinen in der erwarteten Länge, bei keiner Temperatur entstehen weitere Banden. Für alle Primer konnten die gleichen Bedingungen gewählt werden. Der verwendete PCR-Mastermix ist in Tabelle 30 aufgeführt, das PCR-Temperaturprogramm in Tabelle 31.

Tabelle 30: Mastermix für die PCR mit MC-Primern.

Es wurden in der Regel Ansätze mit einem Volumen von je 25 µl verwendet.

Substanz	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen
Wasser	-	-	15,2 µl
Puffer 10-fach	10 µmol/l	1 µmol/l	2,5 µl
Magnesiumchlorid	25 mmol/l	2 mmol/l	2 µl
Glycosylase	1 U	0,02 U	0,5 µl
dNTPs	2,5 mmol/l	0,2 mmol/l	2 µl
Primer 1	20 µmol/l	0,5 µmol/l	0,25 µl
Primer 2	20 µmol/l	0,5 µmol/l	0,25 µl
Polymerase: AmpliTaq Gold™	5 U	2 U	0,3 µl
DNA-Extrakt	-	-	2 µl
Gesamtvolumen	-	-	25 µl

Tabelle 31: PCR-Programm für PCR mit MC-Primern.

Für die kleinen Amplifikate wurde ein Programm mit kurzer Fortführungszeit und der optimalen Anlagerungstemperatur von 65 °C verwendet.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Zyklen
Aktivierung und Aufschmelzung	6:00	96	35
Denaturierung	1:00	96	
Anlagerung	0:30	65	
Fortführung	0:30	72	
Vervollständigung	6:00	72	
Pause	∞	4	

3.2 Sequenzierung

Die Abbildung 33 zeigt den Sequenzvergleich des Amplifikationsabschnitts MC 1f/3r im *mc1r*-Gen zwischen verschiedenen Haus- und Wildschweinen. Die auftretenden Sequenzunterschiede sind in der Tabelle 32 aufgeführt.

	90	100	110	120	130	140	150	160	170
MC1f3r-1	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-5	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-129	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-131	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-132	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-136	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-138	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-140	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-141	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-143	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-145	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
Vergl. HS	-----	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-9	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-13	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-14	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-16	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-19	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-20	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-23	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-40	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
MC1f3r-62	-----CA	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
Vergl. HS	-----	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
Cons. HS	-----	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
Cons. HS	-----	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
Vergl. HS-HS	-----	CTCGCCCATG	TACTACTTCG	TCTGCTGCCT	GGCCGTGTGG	GACCTGCTGG	TGAGCGTGAG	CAACGTGCTG	GAGACGGCCG
	180	190	200	210	220	230	240	250	260
MC1f3r-1	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-5	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-129	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-131	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-132	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-136	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-138	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-140	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-141	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-143	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-145	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
Vergl. HS	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-9	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-13	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-14	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-16	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-19	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-20	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-23	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-40	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
MC1f3r-62	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
Vergl. HS	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
Cons. HS	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
Cons. HS	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
Vergl. HS-HS	TGCTGCTGCT	GCTGGAGGCG	GGCGCCCTGG	CCGCCCAGGC	CGCCGTGTGG	CAGCAGCTGG	ACAATGTCAT	GAACGTGCTC	ATCTGCGGCT
	270	280	290	300	310	320	330	340	350
MC1f3r-1	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-5	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-129	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-131	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-132	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-136	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-138	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-140	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-141	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-143	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-145	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
Vergl. HS	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-9	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-13	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-14	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-16	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-19	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-20	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-23	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-40	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
MC1f3r-62	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
Vergl. HS	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
Cons. HS	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
Cons. HS	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		
Vergl. HS-HS	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCTTGGGCG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTA		

Abbildung 33: Vergleich der Sequenzen von Hausschweinen (obere 11 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 9 Sequenzen) im Amplifikat der Primer MC 1f/ MC 3r.

Zwischen den Wildschweinen gibt es an Position 93 einen Basenaustausch und an Position 242 eine heterozygote Situation. Alle Hausschweine weisen eine untereinander identische Sequenz auf.

ERGEBNISSE
MELANOCORTIN-1-REZEPTOR-GEN

	260	270	280	290	300	310	320	330	340
MC2f5r-1	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-5	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-81	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-123	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-131	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-146	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
Vergl. HS	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-11	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-19	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-23	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-32	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-47	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-52	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-57	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-62	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-66	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
MC2f5r-78	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
Vergl. WS	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
Cons. HS	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
Cons. WS	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
Vergl. HS-WS	-----CT	CCATGGTGTC	CAGCCTCTGC	TTCCTGGGGG	CCATCGCCGT	GGACCGCTAC	GTGTCCATCT	TCTACGCGCT	GCGCTACCAC
	350	360	370	380	390	400	410	420	430
MC2f5r-1	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-5	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-81	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-123	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-131	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-146	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
Vergl. HS	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-11	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-19	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-23	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-32	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-47	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-52	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-57	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-62	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-66	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
MC2f5r-78	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
Vergl. WS	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
Cons. HS	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
Cons. WS	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
Vergl. HS-WS	AGCATCGTGA	CGCTGCCCGG	CGCGGGGGCG	GCCATCGCGG	CCATCTGGGC	GGGCAGCGTG	CTCTCCAGCA	CCCTCTTCAT	GCGCTACTAC
	440	450	460	470	480	490	500	510	520
MC2f5r-1	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-5	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-81	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-123	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-131	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-146	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
Vergl. HS	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-11	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-19	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-23	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-32	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-47	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-52	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-57	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-62	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-66	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
MC2f5r-78	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
Vergl. WS	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
Cons. HS	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
Cons. WS	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	
Vergl. HS-WS	CACCACACGG	CGGTCTGCT	GGGCTCTGTC	AGCTTCTTGG	TGGCCATGCT	GGCGCTCATG	GCGGTACTGT	ACGTCCACAT	

Abbildung 34: Vergleich der Sequenzen von Haus- und Wildschweinen im Amplifikat der Primer MC 2f/MC 5r.

Die Sequenzen aller untersuchten Haus- (obere Sequenzen) und Wildschweinproben (untere Sequenzen) sind in diesem Abschnitt identisch.

Der Sequenzvergleich der Amplifikationsabschnitte MC 2f/5r in Abbildung 34 und MC 4f/6r in Abbildung 35 zeigt, dass alle untersuchten Haus- und Wildschweinproben in diesen Bereichen eine identische Sequenz besitzen.

ERGEBNISSE
MELANOCORTIN-1-REZEPTOR-GEN

	410	420	430	440	450	460	470	480	490
MC4f6r-1			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-131			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
Vergl. HS			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MC4f6r-6			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-11			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-14			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-19			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-23			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-32			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-52			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-62			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-66			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
MC4f6r-78			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
Vergl. WS			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
Cons. WS			-CATCGCCTA	CTACCACCAC	ACGGCCGCTCC	TGCTGGGGCT	CGTCAGCTTC	TTCTGTGGCCA	TGCTGGGGCT
Vergl. HS-WS			-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	500	510	520	530	540	550	560	570	580
MC4f6r-1	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-131	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MC4f6r-6	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-11	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-14	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-19	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-23	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-32	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-52	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-62	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-66	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
MC4f6r-78	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
Cons. WS	CATGGCGGTA	CTGTACGTCC	ACATGCTGGC	CCGGGGCTGC	CAGCACGGCC	GGCACATGCG	CCGGCTCCAC	AAGACGCAGC	ACCCCAACCG
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	590	600	610	620	630	640	650	660	670
MC4f6r-1	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-131	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MC4f6r-6	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-11	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-14	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-19	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-23	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-32	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-52	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-62	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-66	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
MC4f6r-78	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
Cons. WS	CCAGGGCTGC	GGCCTCAAAG	GCGCGGCCAC	CCTCAACATC	CTGCTGGGGC	TCTTCTCTCT	CTGCTGGGCA	CCCTTCTTCC	TGCACCTCTC
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	680	690	700	710	720	730	740	750	760
MC4f6r-1	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-131	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
MC4f6r-6	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-11	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-14	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-19	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-23	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-32	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-52	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-62	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-66	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
MC4f6r-78	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
Cons. HS	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
Cons. WS	CCTCGTCGTC	CTCTGCCCCC	AGCACCCCAC	CTGCGGCTGC	GTCTTCAAGA	ACGTCAACC			
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----			

Abbildung 35: Vergleich der Sequenzen von Haus- und Wildschweinen im Amplifikat der Primer MC4f/ MC 6r.

Die Sequenzen aller untersuchten Haus- (obere Sequenzen) und Wildschweinproben (untere Sequenzen) sind in diesem Abschnitt identisch.

Tabelle 32: Sequenzunterschiede im Bereich von 89-729 Basen des *mc1r*-Gens.

An Position 93 weisen zwei Wildschweine gegenüber den Hausschweinen einen Basenaustausch von C nach T auf, an Position 242 haben vier Wildschweine einen Basenaustausch von A nach G und vier sind heterozygot, zwei sind in ihrer Sequenz identisch zu den Hausschweinen.

Probe	Form	Nukleotid an Position des <i>mc1r</i> -Gens	
		93	242
	Hausschweine	C	A
9	Wildschwein	C	G
13	Wildschwein	T	A/G heterozygot
14	Wildschwein	T	A/G heterozygot
16	Wildschwein	C	G
19	Wildschwein	C	A
20	Wildschwein	C	G
23	Wildschwein	C	A
40	Wildschwein	C	A/G heterozygot
62	Wildschwein	C	G

Der Sequenzvergleich zeigt an Position 242 des *mc1r*-Gens eine heterozygote Situation bei einigen Wildschweinen. Ein Allel weist eine Adenin-, das andere eine Guanin-Base an dieser Position auf. Bei den homozygoten Tieren haben einige Wildschweine eine Guanin-Base an dieser Stelle, während alle Hausschweine eine Adenin-Base an dieser Position aufweisen.

Die Translation des DNA-Codes in die Aminosäure-Sequenz zeigt, dass nur durch den Basenaustausch an Position 242 des *mc1r*-Gens eine veränderte AS-Sequenz entsteht (Abbildung 36), während der Basenaustausch an Position 93 an einer Wobble-Position sitzt und daher keinen Einfluss auf die entstehende AS-Sequenz haben. An Position 242 besitzen Hausschweine auf mindestens einem Allel Adenin als mittlere Base des Codons, während Wildschweine an dieser Position das Nukleotid Guanin aufweisen. Das beim Hausschwein vorhandene Codon GAA codiert für Glutaminsäure, das beim Wildschwein vorhandene Codon GGA für die Aminosäure Glycin.

Hausschwein	LAH VLL RLL PGR VGP AGE REQ RAG DGR AAA AGG GRP GRP
	GRR GAA AGQ CHE RAH LRL HGV QPL LPG RHR RGP LRV HLL
	↑
Wildschwein	LAH VLL RLL PGR VGP AGE REQ RAG DGR AAA AGG GRP GRP
	GRR GAA AGQ CHG RAH LRL HGV QPL LPG RHR RGP LRV HLL
	↑

Abbildung 36: Übertragung von 234 Basen des *mc*-Gens von Hausschwein Nr. 5 (oben) und Wildschwein Nr. 9 (unten) in die korrespondierende Aminosäuresequenz.

An der mit einem Pfeil markierten Stelle weist die AS-Sequenz des Hausschweins Glutaminsäure auf, während die AS-Sequenz des Wildschweins an dieser Stelle Glycin aufweist. Alle weiteren Unterschiede der DNA-Sequenz wirken sich nicht in der AS-Sequenz aus.

3.3 RFLP

Die bei der Sequenzierung identifizierten Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen wurden hinsichtlich eines unterschiedlichen Verhaltens gegenüber Restriktionsenzymen untersucht (Abbildung 37). Die DNA-Sequenz des Wildschweins weist an Position 242 des *mc1r*-Gens Guanin statt Adenin auf. Die Enzyme *PagI*, *BspHI* und *RcaI* (Tabelle 34) schneiden das MC 1f/3r-Amplifikat der Hausschwein-Probe Nr. 1, nicht jedoch das Amplifikat der Wildschwein-Probe Nr. 9.

Tabelle 33: Restriktionsenzyme für die RFLP-Analytik an Position 242 des *mc1r*-Gens.
Aufgeführt sind alle kommerziell erhältlichen Enzyme, die eine Differenzierung von Hausschwein und Wildschwein über den SNP an Nukleotid-Position 242 ermöglichen.

Enzym	Erkennungssequenz	Restriktionstemperatur
<i>RcaI</i>	5'... T/CATGA...3'	30 °C
<i>BspHI</i>	5'... T/CATGA...3'	37 °C
<i>PagI</i>	5'...T/CATGA...3'	30 °C

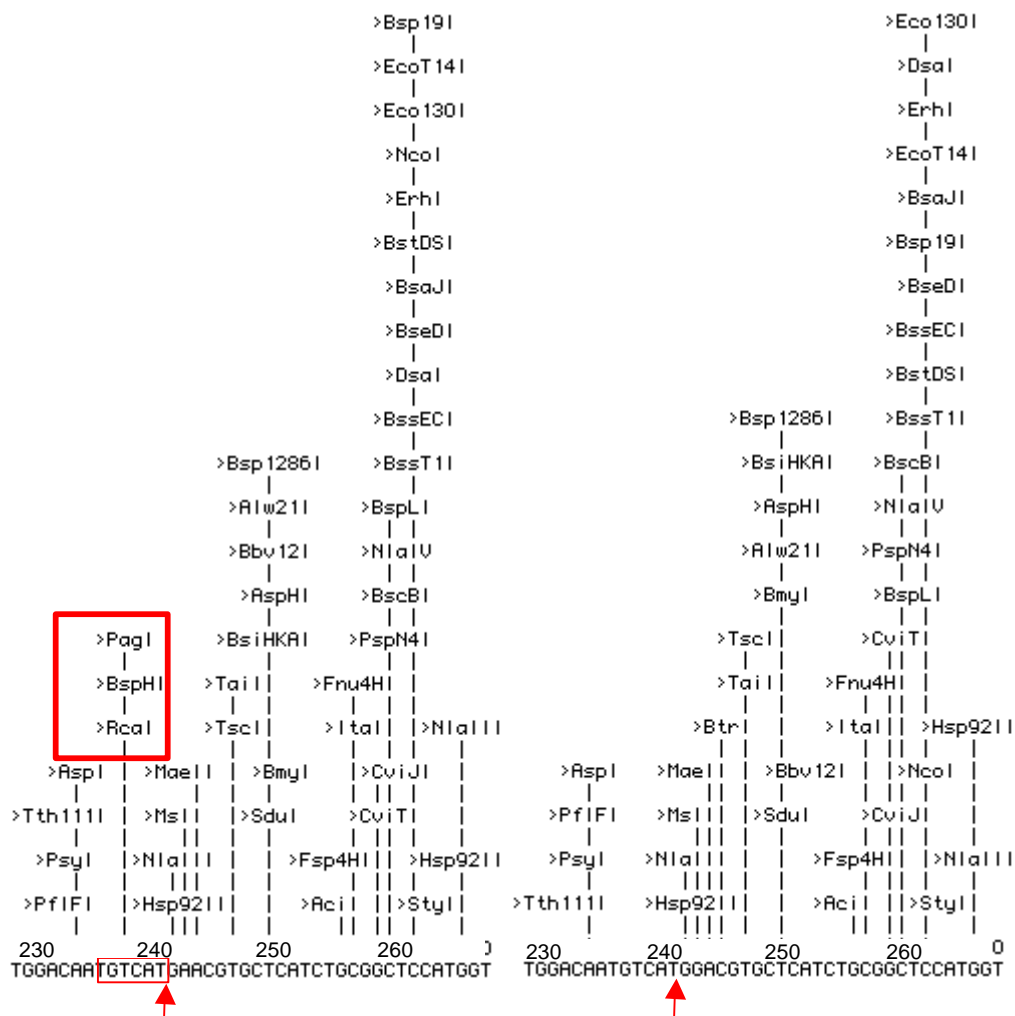
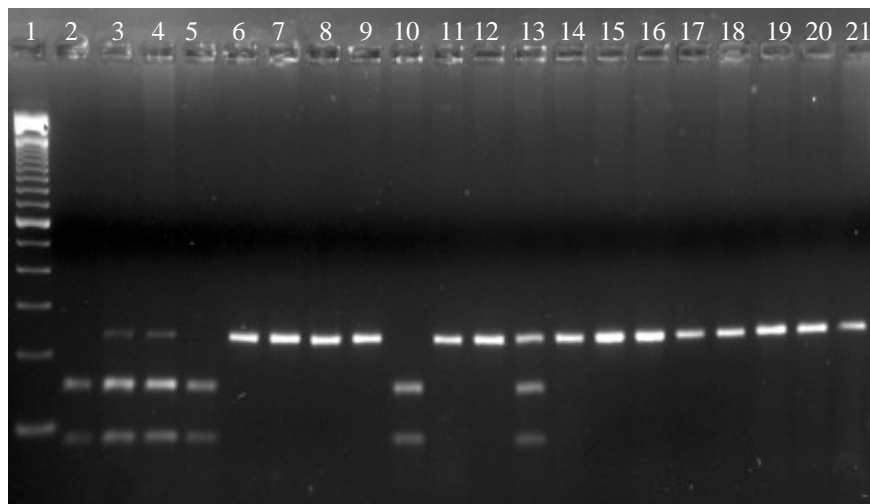


Abbildung 37: Vergleich der schneidenden Restriktionsenzyme im Bereich des Amplifikats der Primer MC 1f/3r.

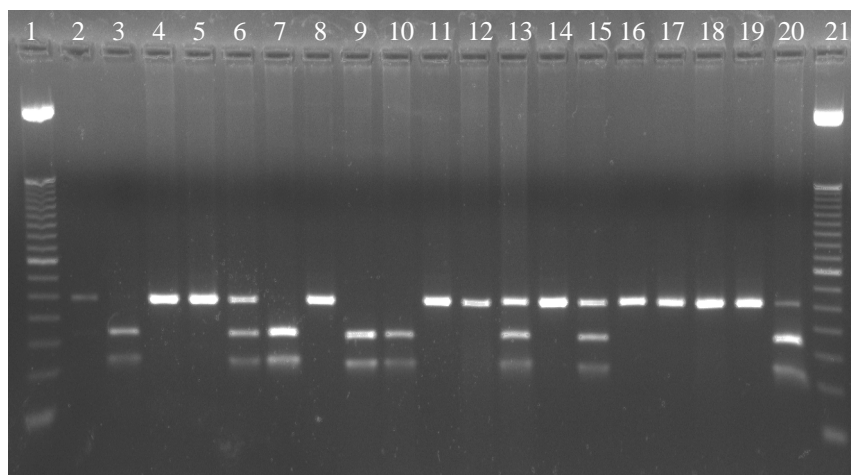
Durch den Basenaustausch an Position 242 des *mc1r*-Gens liegt beim Hausschwein Nr. 1 (links) die Erkennungssequenz für die Enzyme *PagI*, *BspHI* und *RcaI* vor, während diese Enzyme bei der dargestellten Sequenz des Wildschweins Nr. 9 (rechts) nicht schneiden.

Die vorhandenen Proben von Haus- und Wildschweinen wurden mit den Primern MC 1f/MC3r amplifiziert und einem Restriktionsverdau mit *Bsp*HI unterzogen. Die Restriktion der Amplifikate erfolgte in einem Thermocyclerblock bei 37 °C für 16 h. Es wurden 2 Einheiten des Restriktionsenzymys eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente ist in Abbildung 38 und Abbildung 39 zu sehen. Tabelle 34 zeigt die entstandenen Fragmente des Restriktionsverdau. Bei den Hausschweinen 124 und 125 ist noch schwach die ungeschnittene Bande zu sehen, was auf einen unvollständigen Verdau hindeutet. Ein wiederholter Verdau zeigte einen vollständigen Schnitt bei diesen Proben.



Nr.	Probe	ID	Banden
1	100 Bp-Marker		
2	1	HS	92+143
3	124	HS	92+143+(235)
4	125	HS	92+143+(235)
5	126	HS	92+143
6	8	WS	235
7	10	WS	235
8	17	WS	235
9	20	WS	235
10	23	WS	92+143
11	25	WS	235
12	30	WS	235
13	32	WS	92+143+235
14	37	WS	235
15	43	WS	235
16	49	WS	235
17	51	WS	235
18	55	WS	235
19	68	WS	235
20	76	WS	235
21	82	WS	235

Abbildung 38: Gelelektrophorese der RFLP-Analytik von Haus- und Wildschweinen mit dem Primerpaar MC 1f/3r.
Die Amplifikate aller Hausschweinproben und von zwei Wildschweinproben werden geschnitten.



Nr.	Probe	ID	Banden
1	50 Bp-Marker		
2	2	Pute	235
3	3	Rind	92+143
4	4	Huhn	235
5	6	WS	235
6	7	WS	92+143+235
7	19	WS	92+143
8	22	WS	235
9	23	WS	92+143
10	24	WS	92+143
11	31	WS	235
12	33	WS	235
13	34	WS	92+143+235
14	39	WS	235
15	40	WS	92+143+235
16	47	WS	235
17	48	WS	235
18	61	WS	235
19	62	WS	235
20	124	HS	92+143+(235)
21	50 Bp-Marker		

Abbildung 39: Gelelektrophorese der RFLP-Analytik von Haus- und Wildschweinen mit dem Primerpaar MC 1f/3r.
Die Amplifikate von sechs der 15 auf dem Gel befindlichen Wildschweine werden geschnitten. Auch das Amplifikat der DNA von Rind wird geschnitten.

Tabelle 34: Restriktionsfragmente des *Bsp*HI-Verdaus von MC 1f/3r-Amplifikaten verschiedener Tierarten.

Die DNA-Sequenz der Amplifikate aller Hausschweine (HS) und von 14 der untersuchten Wildschweine (WS) wurde in mindestens einem Allel geschnitten. Weitere Proben: P = Pute, R = Rind, H = Huhn.

Probe	Fragmente	Probe	Fragmente	Probe	Fragmente	Probe	Fragmente
1 HS	92+143	26 WS	235	51 WS	235	76 WS	235
2 P	235	27 WS	235	52 WS	235	77 WS	235
3 R	92+143	28 WS	235	53 WS	235	78 WS	235
4 H	235	29 WS	235	54 WS	235	81 HS	92+143
5 HS	92+143	30 WS	235	55 WS	253	82 WS	235
6 WS	235	31 WS	235	56 WS	253	83 WS	235
7 WS	92+143+235	32 WS	92+143+235	57 WS	253	124 HS	92+143
8 WS	235	33 WS	235	58 WS	253	125 HS	92+143
9 WS	235	34 WS	92+143+235	59 WS	235	126 HS	92+143
10 WS	235	35 WS	92+143+235	60 WS	92+143+235	129 HS	92+143
11 WS	92+143+235	36 WS	235	61 WS	235	131 HS	92+143
12 WS	235	37 WS	235	62 WS	235	132 HS	92+143
13 WS	92+143+235	38 WS	235	63 WS	235	136 HS	92+143
14 WS	92+143+235	39 WS	235	64 WS	235	138 HS	92+143
15 WS	92+143+235	40 WS	92+143+235	65 WS	235	140 HS	92+143
16 WS	235	41 WS	235	66 WS	235	141 HS	92+143
17 WS	235	42 WS	235	67 WS	235	143 HS	92+143
18 WS	235	43 WS	235	68 WS	235	145 HS	92+143
19 WS	92+143	44 WS	235	69 WS	235		
20 WS	235	45 WS	235	70 WS	235		
21 WS	235	46 WS	235	71 WS	235		
22 WS	235	47 WS	235	72 WS	235		
23 WS	92+143	48 WS	235	73 WS	92+143+235		
24 WS	92+143	49 WS	235	74 WS	235		
25 WS	235	50 WS	235	75 WS	235		

Die Amplifikate der DNA aller Hausschweinproben werden geschnitten, während 81 % der amplifizierten DNA von Wildschweinproben in beiden Allelen ungeschnitten bleibt. Eine heterozygote Situation findet sich bei 15 % der Wildschweine. Ein Schnitt beider Allele erfolgt nur bei 4 % der Wildschweine. Eine Zusammenfassung der Restriktionsmuster zeigt Tabelle 35. Damit sind alle nicht geschnittenen Amplifikate als DNA von Wildschweinen zu identifizieren, während Hausschweine nicht sicher identifiziert werden können.

Tabelle 35: Auswertung der RFLP-Analytik von den MC 1f/3r-Amplifikaten mit *Bsp*HI.

Die Amplifikate aller Hausschwein-DNA-Proben werden geschnitten, während die Amplifikate der DNA von 81 % der Wildschweinproben nicht geschnitten werden. 4 % der Wildschweinproben weisen einen Schnitt bei den Amplifikaten beider Allele auf.

Restriktionsmuster	Wildschweinproben		Hausschweinproben	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
235 Bp	61	81 %	0	0 %
92+143+235 Bp	11	15 %	0	0 %
92+143 Bp	3	4 %	15	100 %

4 D-LOOP-BEREICH

4.1 PCR

Zur Entwicklung der Primer im D-Loop-Bereich wurde die DNA-Sequenz verschiedener Tierarten miteinander verglichen, um konservierte Bereiche zu finden (beispielhaft gezeigt beim *cytB*-Gen). Ein Ausschnitt dieses Vergleichs in Abbildung 40 zeigt die großen Unterschiede, die zwischen den Tierarten Schwein (*Sus scrofa*) und Rind (*Bos taurus*) in bestimmten Bereichen des D-Loops vorhanden sind.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pig 1	C	CCCAA	AAA		TT	TA		AC			CAT
cattle	caatcccaaa	caaacctagga	ggagtactag	ccttagcctt	ctctatccta	attcttgctc	taatccccc	actacacac	tcacacacac	gaagcsta	
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
pig 1	attccgagcca	ctcagcccaat	gcctattctg	agccctagta	gcagacctac	tgacactcac	atgaatttga	ggacacacag	tcgaacacac	atatatccc	
cattle		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
pig 1	ANAA	atcgacacac	tagctctgt	ctctatactt	ctctctatcc	tagtgcata	acccacggcc	ggacacatg	aaaacacatt	actaacatga	agacaggtct
cattle		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
pig 1	TTAAATAT	T	A			TAAAC	ATG	T	AC	ATC	
cattle	ttgtagtaca	ctcattatcc	tggtcttgta	aaccagagaa	ggagacacac	taacctccct	aagactcaag	gaagaaactg	cagtctcacc	atcaacccc	
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
pig 1	aaagctgaag	ttctattttaa	actattccct	gaacactatt	aatatagttc	catataatac	aagagcctta	tcagtattaa	atttatcaaa	aatcccaata	
cattle		510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
pig 1	actcaacaca	gaattttgac	ctcaccacaa	tattacaac	accactagct	aacataaac	gccacacac	agacacaga	atgaattacc	taagcaaggg	
cattle		610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
pig 1	TCTACA	TA	TTATT	AT	TAAATAT	T	ACATACATAC	T	ATTAT		
cattle	gtaattgtaca	tacatttacc	gtaataaaga	cataatattg	atattagtaa	ttasattata	tgcccatgac	atataagcaa	gtacatgacc	tctatagcag	
		710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
pig 1	TACATACAC	ATATCAT	ATC	AAA	TA	ACTCCA	ATCAA	ATATC	ATATC	ATATC	
cattle	tacataaac	atataattat	tgactgtaca	tagtacatta	tgtcaaatc	attcttgata	gtatatctat	tatatattcc	ttaccattag	atcaagagct	
		810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
pig 1	TAAATACCAT	CCCCCCTTAA	AAACACAC	CCCTTCCA	GGATACCC	TTCTNACCT	CCGACCTTA	AAACCTGAAA	ATTCTAT	TTA	
cattle	taattaccat	gac-gcgtga	aaccagcaac	cagctaggca	gggacccctc	ttctc-gctc	cgggccata	aaccgtgggg	gtcctatccc	aatga	

Abbildung 40: Sequenzvergleich des Amplifikats der Primer DL 1f/3r zwischen Hausschwein (pig1) und Rind (cattle).

Die „-“ zeigen Deletionen an, Basenaustausche sind nicht markiert. Ab Position 783 beginnt ein Sequenzabschnitt mit großer Übereinstimmung zwischen den Tierarten, davor bestehen sehr große Unterschiede zwischen den DNA-Sequenzen.

In Abbildung 41 sind die Lage der entwickelten Primer und die daraus resultierenden Amplifikate schematisch dargestellt. Der erste Primer für die D-Loop-PCR (DL 1f) liegt im benachbarten Gen für die Prolin-transfer-RNA, der letzte Primer (DL 6r) im Gen für die Phenylalanin-transfer-RNA, so dass die Amplifikation des gesamten D-Loop-Bereichs möglich ist. Der verwendete PCR-Ansatz ist in Tabelle 36 und das optimierte PCR-Temperaturprogramm in Tabelle 37 dargestellt.

ERGEBNISSE

D-LOOP-BEREICH

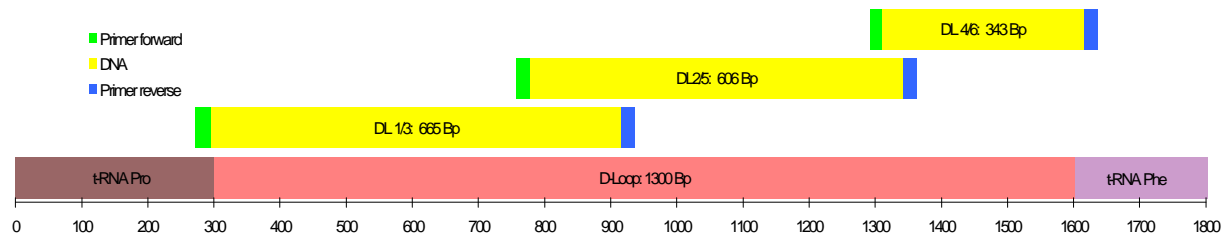


Abbildung 41: Primer und Amplifikate im D-Loop-Bereich.

Drei Primerpaare decken den 1300 Bp großen D-Loop-Bereich ab. Die äußeren Primer liegen in den angrenzenden Bereichen, die für die t-RNA von Prolin bzw. Phenylalanin codieren.

Tabelle 36: Mastermix für die PCR mit DL-Primern.

Es wurden in der Regel Ansätze mit einem Volumen von je 25 µl verwendet. Als optimale Magnesiumchloridlösung für die DL-Primer wurde 3 mmol/l bestimmt.

Substanz	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen
Wasser	-	-	13,45 µl
Puffer 10-fach	10 µmol/l	1 µmol/l	2,5 µl
Magnesiumchlorid	25 mmol/l	3 mmol/l	3 µl
Glycosylase	1 U	0,02 U	0,5 µl
dNTPs	2,5 mmol/l	0,2 mmol/l	2 µl
Primer 1	20 µmol/l	0,5 µmol/l	0,625 µl
Primer 2	20 µmol/l	0,5 µmol/l	0,625 µl
Polymerase: AmpliTaq Gold™	5 U	2 U	0,3 µl
DNA-Extrakt	-	-	2 µl
Gesamtvolumen	-	-	25 µl

Tabelle 37: PCR-Temperaturprogramm für PCR mit DL-Primern.

Für die größeren Amplifikate wurde ein Programm mit längerer Fortführungszeit und verschiedenen Anlagerungstemperatur von 55 bis 65 °C verwendet.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Zyklen
Aktivierung und Aufschmelzung	6:00	96	35
Denaturierung	1:00	96	
Anlagerung	0:30	DL 1f/3r: 55	
		DL 2f/5r: 65	
		DL 4f/6r: 60	
Fortführung	1:00	72	
Vervollständigung	6:00	72	
Pause	∞	4	

4.2 Sequenzierung

Abbildung 42 bis Abbildung 46 zeigen den Vergleich der sequenzierten DNA-Abschnitte von Haus- und Wildschweinen. Die Zeile „Vergl. HS“ zeigt mit „*“ Sequenzunterschiede zwischen den Hausschweinen, die Zeile „Vergl. WB“ Sequenzunterschiede zwischen den Wildschweinen an. Diese Unterschiede innerhalb der Unterart waren für eine Differenzierung der Unterarten nicht geeignet. Die Zeile „Vergl. HS-WB“ zeigt mit „*“ jene Sequenzunterschiede an, die zwischen Haus- und Wildschweinen auftraten.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
DL1f3r-1	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-5	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-93	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-130	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-135	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-141	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-142	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-143	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-147	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-11	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-12	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-63	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-68	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
DL1f3r-77	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
Vergl. WB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
Cons. WB	CAACCAAAAC	AAGCATTTCCA	TTCGTATGCA	AACCAAAACG	CCAAGTACTT	AATTACTATC	TTTAAACAA	AAAAACCCAT	AAAAATTGCG
Vergl. HS-WB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
DL1f3r-1	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-5	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-93	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-130	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-135	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-141	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-142	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-143	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-147	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-11	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-12	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-63	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-68	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
DL1f3r-77	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTTAAACATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
Vergl. WB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTT*ACCATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
Cons. WB	CACAAACATA	CAAATATGTG	ACCCCAAAAA	TTT*ACCATT	GAAAACCAAA	AAATCTAATA	TACTATAACC	CTATGTACGT	CGTGCATTAA
Vergl. HS-WB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 42: Vergleich der Sequenzen von Haus- (obere 9 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 5 Sequenzen) im ersten Teil des Amplifikats der Primer DL 1f/3r.

Die „*“ zeigen Unterschiede zwischen den ausgerichteten Sequenzen der Individuen einmal zwischen allen Hausschweinen (oben), den Wildschweinen (Mitte) und zwischen Haus- und Wildschweinen (unten). An Position 120 des D-Loops weicht nur die Sequenz eines Hausschweins von den anderen Tieren ab, an Position 124 gibt es sowohl bei Hausschweinen als auch bei Wildschweinen zwei Sequenzvarianten.

ERGEBNISSE
D-LOOP-BEREICH

	190	200	210	220	230	240	250	260	270
DL1f3r-1	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-5	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-93	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-130	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-135	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-141	CTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATAATATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-142	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-143	CTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATAATATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-147	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
Vergl. H5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-11	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-12	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-63	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-68	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
DL1f3r-77	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
Vergl. W5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. H5	*TGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATA*TATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
Cons. W5	TTGCTAGTCC	CCATGTCATAT	AAGCATGTAC	ATATTATTAT	TAATATTACA	TAGTACATAT	TATTATTGAT	CGTACATAGC	ACATATCATG
Vergl. H5-W5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
DL1f3r-1	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-5	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-93	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-130	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-135	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-141	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-142	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-143	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-147	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
Vergl. H5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-11	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-12	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-63	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-68	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
DL1f3r-77	TCAAATAACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
Vergl. W5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. H5	TCAAA*AACT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCA*TAGA	TCACGAGCTT	AA*TACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
Cons. W5	TCAAAATA*CT	CCAGTCAACA	TGCATATCAC	CACCATTAGA	TCACGAGCTT	AATTACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG
Vergl. H5-W5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
DL1f3r-1	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-5	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-93	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-130	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-135	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-141	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-142	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-143	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-147	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
Vergl. H5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-11	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-12	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAT	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-63	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAT	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-68	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
DL1f3r-77	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAT	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
Vergl. W5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. H5	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
Cons. W5	GATCCCTCTT	CTCGCTCCGG	GCCCATAAAC	CGTGGGGGTT	TCTATTGATG	AACTTTAACA	GGCATCTGGT	TCTTACTTCA	GGACCATCTC
Vergl. H5-W5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
DL1f3r-1	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-5	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-93	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-130	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-135	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-141	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-142	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-143	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
DL1f3r-147	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
Vergl. H5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-11	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-12	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-63	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-68	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-77	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. W5	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. H5	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	TCCCCTTAAA	TAAGACATCT	CGATGGACTA	ATGACTAATC	AGCCCATGCT	CACACATAAC	TGAGGTTTCA
Cons. W5	ACCTAAAAATC	GCCCACTCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. H5-W5	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Abbildung 43: Vergleich der Sequenzen von Hausschweinen (obere 9 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 5 Sequenzen) im zweiten Teil des Amplifikats der Primer DL 1f/3r.

Die „*“ zeigen Unterschiede zwischen den ausgerichteten Sequenzen der Individuen einmal zwischen allen Hausschweinen (oben), den Wildschweinen (Mitte) und zwischen Haus- und Wildschweinen (unten). Mit Pfeilen markiert sind die sieben Nukleotide, bei denen eine Form einheitlich ist, während einige Individuen der anderen Form eine Nukleotid-Substitution vorhanden ist.

ERGEBNISSE
D-LOOP-BEREICH

	550	560	570	580	590	600	610	620	630
DL1f3r-1	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-5	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-93	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-130	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-135	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-141	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-142	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-143	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
DL1f3r-147	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-63	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-68	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL1f3r-77	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	TACATTGGT	ATTTTAAAT	TTTTGGGAT	GCITAGACTC	AGCCATGGCC	GTCAAAGGCC	CTAACACAGT	CAAAATCAATT	GTAGCTGGAC
Cons. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. HS-WS	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Abbildung 44: Vergleich der Sequenzen von Hausschweinen (obere 9 Sequenzen) und Wildschweinen (untere 5 Sequenzen) im dritten Teil des Amplifikats der Primer DL 1f/3r.

In diesem Abschnitt weisen alle sequenzierten Individuen eine identische DNA-Sequenz auf.

	570	580	590	600	610	620	630	640	650
DL2f5r-1	---ATAAGA	CATCTCGATG	GACTAATGAC	TAATCAGCCC	ATGCTCACAC	ATAACTGAGG	TTTCATACAT	TTGGTATTTT	TTAATTTTTG
DL2f5r-118	---ATAAGA	CATCTCGATG	GACTAATGAC	TAATCAGCCC	ATGCTCACAC	ATAACTGAGG	TTTCATACAT	TTGGTATTTT	TTAATTTTTG
DL2f5r-119	---ATAAGA	CATCTCGATG	GACTAATGAC	TAATCAGCCC	ATGCTCACAC	ATAACTGAGG	TTTCATACAT	TTGGTATTTT	TTAATTTTTG
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL2f5r-47	---ATAAGA	CATCTCGATG	GACTAATGAC	TAATCAGCCC	ATGCTCACAC	ATAACTGAGG	TTTCATACAT	TTGGTATTTT	TTAATTTTTG
DL2f5r-52	---ATAAGA	CATCTCGATG	GACTAATGAC	TAATCAGCCC	ATGCTCACAC	ATAACTGAGG	TTTCATACAT	TTGGTATTTT	TTAATTTTTG
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	---ATAAGA	CATCTCGATG	GACTAATGAC	TAATCAGCCC	ATGCTCACAC	ATAACTGAGG	TTTCATACAT	TTGGTATTTT	TTAATTTTTG
Cons. WS	---ATAAGA	CATCTCGATG	GACTAATGAC	TAATCAGCCC	ATGCTCACAC	ATAACTGAGG	TTTCATACAT	TTGGTATTTT	TTAATTTTTG
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	660	670	680	690	700	710	720	730	740
DL2f5r-1	GGGATGCTTA	GACTCAGCCA	TGGCCGTCAA	AGGCCCTAAC	ACAGTCAAAAT	CAATTGTAGC	TGGACTTCAT	GGAACCTCATG	ATCCGGCACG
DL2f5r-118	GGGATGCTTA	GACTCAGCCA	TGGCCGTCAA	AGGCCCTAAC	ACAGTCAAAAT	CAATTGTAGC	TGGACTTCAT	GGAACCTCATG	ATCCGGCACG
DL2f5r-119	GGGATGCTTA	GACTCAGCCA	TGGCCGTCAA	AGGCCCTAAC	ACAGTCAAAAT	CAATTGTAGC	TGGACTTCAT	GGAACCTCATG	ATCCGGCACG
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL2f5r-47	GGGATGCTTA	GACTCAGCCA	TGGCCGTCAA	AGGCCCTAAC	ACAGTCAAAAT	CAATTGTAGC	TGGACTTCAT	GGAACCTCATG	ATCCGGCACG
DL2f5r-52	GGGATGCTTA	GACTCAGCCA	TGGCCGTCAA	AGGCCCTAAC	ACAGTCAAAAT	CAATTGTAGC	TGGACTTCAT	GGAACCTCATG	ATCCGGCACG
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	GGGATGCTTA	GACTCAGCCA	TGGCCGTCAA	AGGCCCTAAC	ACAGTCAAAAT	CAATTGTAGC	TGGACTTCAT	GGAACCTCATG	ATCCGGCACG
Cons. WS	GGGATGCTTA	GACTCAGCCA	TGGCCGTCAA	AGGCCCTAAC	ACAGTCAAAAT	CAATTGTAGC	TGGACTTCAT	GGAACCTCATG	ATCCGGCACG
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	750	760	770	780	790	800	810	820	830
DL2f5r-1	ACAATCCAAA	CAAGGTGCTA	TTTCAGTCAAT	GGTTACGGGA	CATAACGTAC	ATACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-118	ACAATCCAAA	CAAGGTGCTA	TTTCAGTCAAT	GGTTACGGGA	CATAACGTAC	ATACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-119	ACAATCCAAA	CAAGGTGCTA	TTTCAGTCAAT	GGTTACGGGA	CATAACGTAC	ATACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL2f5r-47	ACAATCCAAA	CAAGGTGCTA	TTTCAGTCAAT	GGTTACGGGA	CATAACGTAC	ATACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-52	ACAATCCAAA	CAAGGTGCTA	TTTCAGTCAAT	GGTTACGGGA	CATAACGTAC	ATACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	ACAATCCAAA	CAAGGTGCTA	TTTCAGTCAAT	GGTTACGGGA	CATAACGTAC	ATACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Cons. WS	ACAATCCAAA	CAAGGTGCTA	TTTCAGTCAAT	GGTTACGGGA	CATAACGTAC	ATACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	840	850	860	870	880	890	900	910	920
DL2f5r-1	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-118	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-119	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL2f5r-47	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-52	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Cons. WS	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010
DL2f5r-1	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-118	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-119	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL2f5r-47	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
DL2f5r-52	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Cons. WS	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
DL2f5r-1	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG
DL2f5r-118	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG
DL2f5r-119	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DL2f5r-47	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG
DL2f5r-52	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG
Cons. WS	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACGTGC	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG	GTACACG
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 45: Sequenzvergleich des Amplifikationsabschnitts DL 2f/5r zwischen Hausschweinen (obere Sequenzen) und Wildschweinen (untere Sequenzen).

In diesem Abschnitt liegt nur eine Punktmutation von Hausschwein 1, die anderen Sequenzen sind identisch.

ERGEBNISSE

D-LOOP-BEREICH

[illegible]

Abbildung 46: Sequenzvergleich des Amplifikationsabschnitts DL 4f/6r zwischen Hausschweinen (oben) und Wildschwein (unten).

Die fünf in diesem Sequenzabschnitt auftretenden Basenaustausche sind jeweils nur bei einem Individuum vorhanden.

Die Sequenzierung der Amplifikate, die mit den Primern DL 4f/6r erhalten wurden, haben schlecht auswertbare Elektropherogramme ergeben. Bei diesen Primern war bereits die Erstellung einer PCR-Methode zum Erhalt von deutlichen Banden schwierig. Unter Verwendung einer höheren Magnesiumchloridkonzentration und einer niedrigeren Annealingtemperatur konnten jedoch gute Resultate erhalten werden. Mit diesen Primern wurden bei der PCR mit Rinder-, Huhn- und Puten-DNA keine im Agarosegel sichtbaren Amplifikate mehr gebildet.

Der Vergleich zwischen den DNA-Sequenzen der Schweine zeigte insgesamt 15 Punktmutationen, von denen acht jeweils nur bei einem der sequenzierten Individuen auftraten. Ein SNP trat bei mehreren Individuen von Haus- und Wildschweinen auf, sechs SNPs jeweils bei mehreren Individuen nur einer Form.

Tabelle 38: Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen im D-Loop.

In der Tabelle sind die Nukleotidpositionen aufgeführt, die bei mindestens zwei sequenzierten Proben eine abweichende DNA-Sequenz haben. Dargestellt sind jeweils die Sequenzunterschiede im Vergleich zur Sequenz des Hausschweins 1.

Probe	Form	Nukleotid im D-Loop an Position						
		181	214	276	279	306	323	390
1	HS	T	T	T	C	T	T	C
5	HS	-	-	-	-	T	-	-
93	HS	-	-	-	-	C	C	-
130	HS	-	-	-	-	C	-	-
135	HS	-	-	-	-	C	C	-
141	HS	C	A	C	-	C	C	-
142	HS	-	-	-	-	C	C	-
143	HS	C	A	C	-	C	C	-
147	HS	-	-	-	-	C	-	-
11	WS	-	-	-	-	C	C	-
12	WS	-	-	-	T	C	C	T
63	WS	-	-	-	T	C	C	T
68	WS	-	-	-	-	C	C	-
77	WS	-	-	-	T	C	C	T

4.3 Restriktion

Die Sequenzierung des Amplifikats aus dem D-Loop-Bereich mit den Primern DL 1f/3r zeigte an Position 317 und 334 des D-Loops zwei nahe beieinander gelegenen Stellen mit Sequenzunterschieden zwischen Haus- und Wildschweinen. Für diese Sequenzunterschiede wurden Restriktionsenzyme gesucht, die in einer RFLP-Analytik die Unterschiede sichtbar machen können (Abbildung 47).

Zur RFLP-Analytik wurden die in Tabelle 39 aufgeführten Enzyme ausgewählt. Aufgrund der unterschiedlichen Restriktionstemperaturen und der größeren Anzahl an Restriktionsfragmenten (Abbildung 48) ist die Verwendung beider Enzyme in einem Restriktionsansatz nicht möglich.

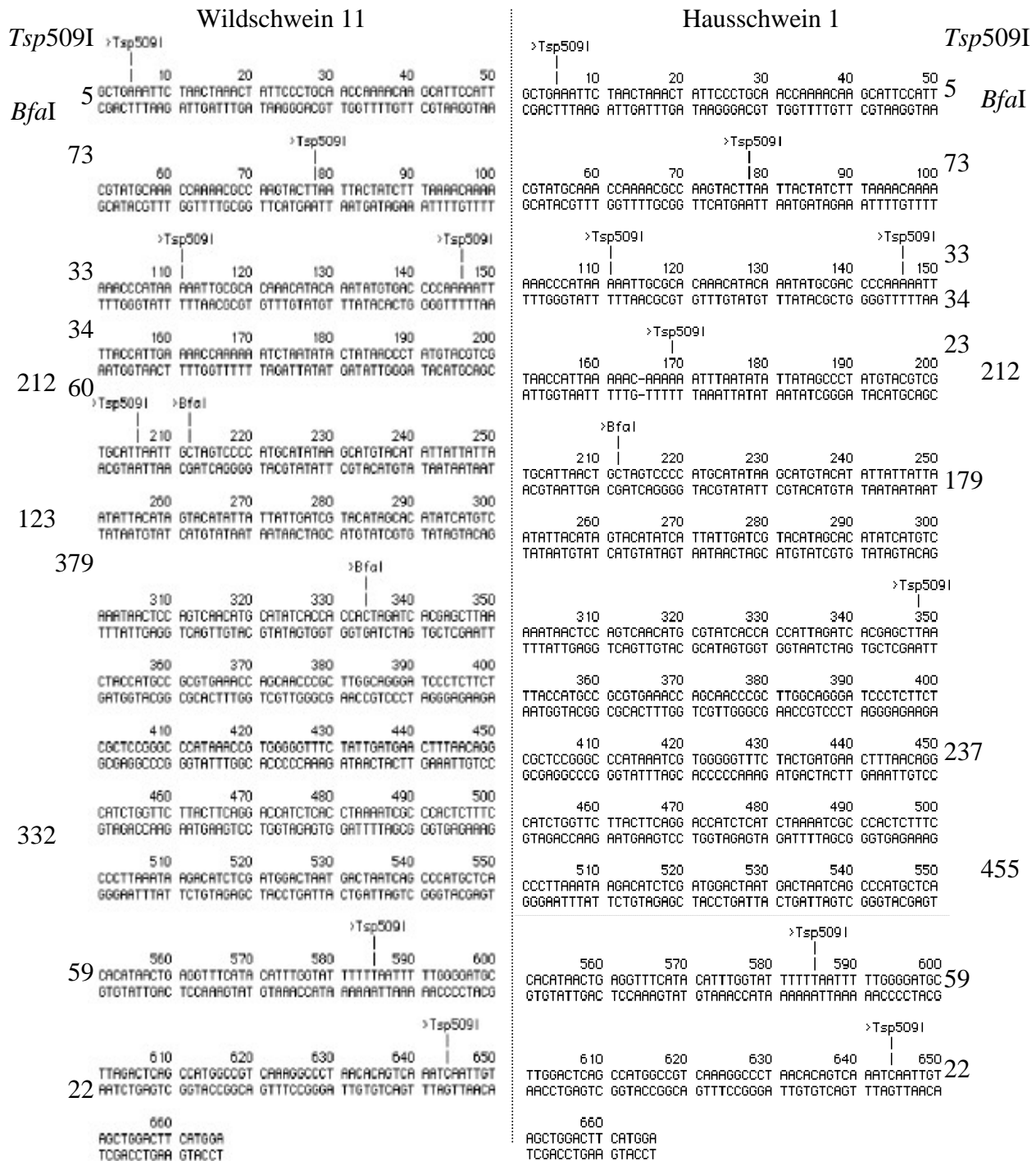


Abbildung 48: Vergleich der Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Tsp509I* und *BfaI* bei den DNA-Sequenzen einer Haus- und Wildschweinprobe im DL 1f/3r-Amplifikat.

Das Amplifikat der Hausschweinprobe Nr. 1 (rechts) weist mit *Tsp509I* sieben Schnittstellen auf, das Wildschwein Nr. 11 (links) nur fünf. Mit *BfaI* wird das Amplifikat der Hausschwein-DNA nur einmal geschnitten, das des Wildschweins zweimal. Die Größe der entstehenden Fragmente ist an der Seite angegeben.

Tabelle 40: Theoretisch entstehende Restriktionsfragmente bei dem Verdau des DL 1f/3r-Amplifikats mit *Tsp509I* bzw. *BfaI*.

Mit *BfaI* entsteht bei Haus- und Wildschweinen eine unterschiedliche Anzahl von Fragmenten mit z.T. unterschiedlichen Fragmentgrößen, die über Gelelektrophorese gut identifizierbar sind. Mit *Tsp509I* entstehen zahlreiche Fragmente, bei denen nur die großen gut differenzierbar sind.

Probe	<i>Tsp509I</i>	<i>BfaI</i>
Wildschwein 11	5+22+23+45+59+60+73+379	123+212+332
Hausschwein 1	5+22+23+23+45+59+73+179+237	212+455

In Abbildung 48 und Tabelle 40 sind die Sequenzen der Proben Hausschwein 1 und Wildschwein 11 miteinander verglichen worden. Zu anderen Haus- bzw. Wildschweinen gibt es Sequenzabweichungen, die zum Wegfall oder zum Entstehen von Restriktionsschnittstellen führen können, so dass auch innerhalb einer Unterart verschiedene Restriktionsmuster entstehen können. Die tatsächlich entstandenen Restriktionsmuster wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit mit Buchstaben bezeichnet: A = 240+480 Bp, B = Wildschwein-typischer Schnitt, C, D = weitere Schnittmuster, - = kein Schnitt.

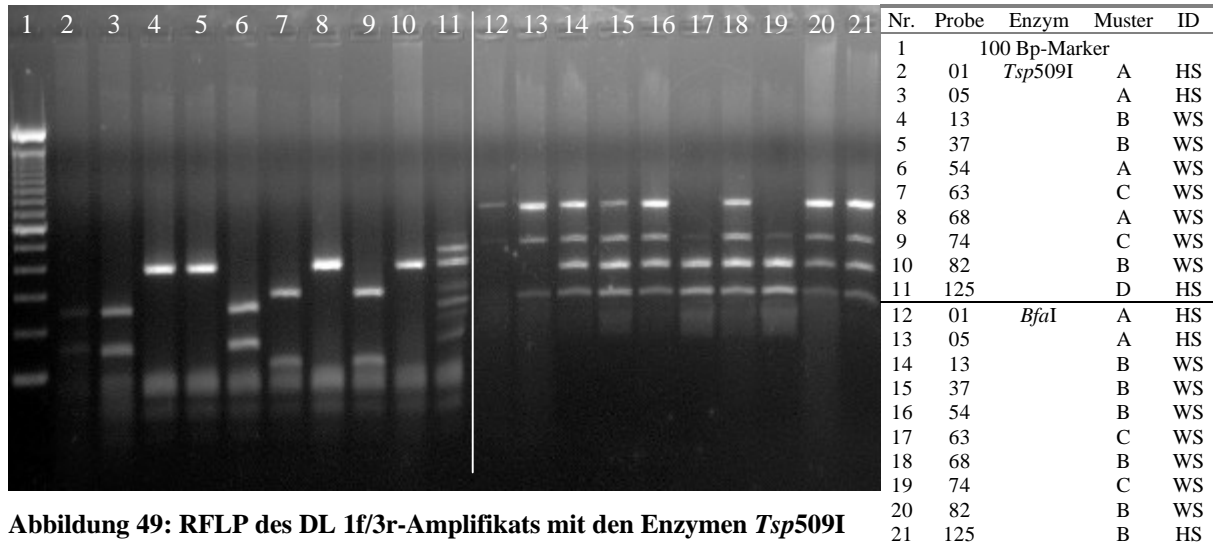


Abbildung 49: RFLP des DL 1f/3r-Amplifikats mit den Enzymen *Tsp509I* (links) und *BfaI* (rechts). Den entstehenden Fragmentmustern wurden Buchstaben zugeordnet, die rechts in der Probentabelle aufgeführt sind. Die zahlreichen Banden bei der RFLP mit *BfaI* resultieren aus einem unvollständigen Verdau der Fragmente.

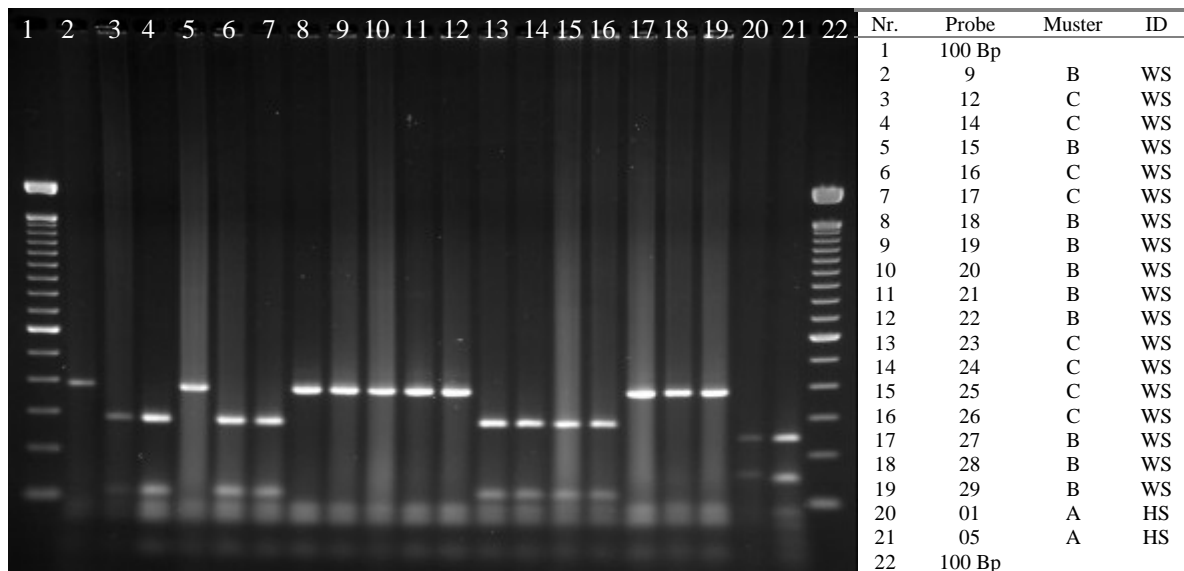


Abbildung 50: RFLP-Analytik des DL 1f/3r-Amplifikats mit dem Restriktionsenzym *Tsp509I*. Den entstehenden Fragmentmustern wurden Buchstaben zugeordnet, die rechts in der Probentabelle aufgeführt sind. Es entstehen drei verschiedene Restriktionsmuster.

Tabelle 41: Vergleich der RFLP-Ergebnisse im DL 1f/3r- und im MC 1f/3r-Amplifikat.

Für die untersuchten Proben sind die entstandenen Restriktionsfragmente bei dem Verdau mit verschiedenen Enzymen aufgeführt. Den Fragmentmustern wurden Buchstaben zugeordnet. (Form: HS = Hausschwein, WS = Wildschwein).

Probe	Form	DL 1f/3r - <i>Bfa</i> I	Muster	DL 1f/3r - <i>Tsp</i> 509I	Muster	MC 1f/3r - <i>Bsp</i> HI	Muster
1	HS	240+480+665	A	150+250	A	92+143	A
2						235	-
3						92+143	
4						235	-
5	HS	240+480+665	A	150+250	A	92+143	C
6	WS					235	-
7	WS					92+143+235	C
8	WS					235	-
9	WS			390	-	235	-
10	WS					235	-
11	WS					92+143+235	C
12	WS	140+240+350		110+290	B	235	-
13	WS	240+350+480+665	B	390	-	92+143+235	C
14	WS	140+240+350		110+290	B	92+143+235	C
15	WS	140+240+350		390	-	92+143+235	C
16	WS	140+240+350		110+290	B	235	-
17	WS	140+240+350		110+290	B	235	-
18	WS	140+240+350		390	-	235	-
19	WS	140+240+350		390	-	92+143	A
20	WS	140+240+350		390	-	235	-
21	WS			390	-	235	-
22	WS			390	-	235	-
23	WS	140+240+350		110+290	B	92+143	A
24	WS			110+290	B	92+143	A
25	WS			110+290	B	235	-
26	WS			110+290	B	235	-
27	WS			390	-	235	-
28	WS			390	-	235	-
29	WS			390	-	235	-
30	WS			110+290	B	235	-
31	WS			110+290	B	235	-
32	WS	140+240+350		150+250	A	92+143+235	C
33	WS			110+290	B	235	-
34	WS			390	-	92+143+235	C
35	WS			110+290	B	92+143+235	C
36	WS			110+290	B	235	-
37	WS	240+350+480+665	B	390	-	235	-
38	WS			110+290	B	235	-
39	WS			110+290	B	235	-
40	WS			110+290	B	92+143+235	C
41	WS			110+290	B	235	-
42	WS			110+290	B	235	-
43	WS	140+240+350		150+250	A	235	-
44	WS	140+240+350		150+250	A	235	-
45	WS	140+240+350		150+250	A	235	-
46	WS	140+240+350		150+250	A	235	-
47	WS	140+240+350		150+250	A	235	-
48	WS	140+240+350		150+250	A	235	-
49	WS	140+240+350		150+250	A	235	-
50	WS	140+240+350+(480)+(665)		150+250	A	235	-
51	WS	240+350+480	C	150+250	A	235	-
52	WS	240+350+480	C	150+250	A	235	-
53	WS	240+350+480+665	B	150+250	A	235	-
54	WS	240+350+480+665	B	150+250	A	235	-
55	WS	240+350+480+665	B	150+250	A	253	-

↪ Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

ERGEBNISSE
D-LOOP-BEREICH

Probe	Form	DL 1f/3r - <i>Bfa</i> I	Muster	DL 1f/3r - <i>Tsp</i> 509I	Muster	MC 1f/3r - <i>Bsp</i> HI	Muster
56	WS	240+350+480+665	B	150+250	A	253	-
57	WS	240+350+480+665	B	390	-	253	-
58	WS	240+350+480+665	B			253	-
59	WS	240+350+480+665	B			235	-
60	WS	240+350+480+665	B	390	-	92+143+235	C
61	WS	240+350+480+665	B	390	-	235	-
62	WS	240+350+480+665	B	390	-	235	-
63	WS	240+350+480	C	110+290	B	235	-
64	WS					235	-
65	WS	240+350+480+665	B	110+290	B	235	-
66	WS	240+350+480+665	B	390	-	235	-
67	WS	240+350+480+665	B	450	-	235	-
68	WS	240+350+480+665	B	150+250	A	235	-
69	WS	240+350+480+665	B	110+290	B	235	-
70	WS	240+350+480+665	B	110+290	B	235	-
71	WS	240+350+480+665	B	110+290	B	235	-
72	WS					235	-
73	WS	240+350+480+665	B	390	-	92+143+235	-
74	WS	240+350+480	C	110+290	B	235	-
75	WS	240+350+480+665	B	110+290	B	235	-
76	WS	240+350+480+665	B	390	-	235	-
77	WS					235	-
78	WS					235	-
79	WS						
80	WS						
81	WS			390	-		
82	WS	665+480+350+240	B	150+250	A	235	-
83	WS					235	-
120	HS	240+350+480+665	C	220+250	C		
124	HS					94+143+235	
125	HS					94+143+235	
126	HS	240+350+480+665	C	250+390+450	D	94+143	

Tabelle 41 zeigt, dass es keine ausschließliche Kopplung zwischen den Restriktionsmustern der beiden Restriktionsendonukleasen gibt. Tabelle 42 und Tabelle 43 zeigen die Häufigkeit der entstehenden Muster beim Verdau des DL1f/3r-Amplifikats der Haus- bzw. Wildschweinproben mit den beiden Restriktionsenzymen. Die einzige Korrelation besteht zwischen dem Muster B des Enzyms *Bfa*I und dem nicht schneidenden *Tsp*509I, da alle nicht geschnittenen DNA-Sequenzen bei *Bfa*I ein Muster B bilden. Der insgesamt schwache Zusammenhang zeigt aber, dass die gleichzeitige Betrachtung beider Punktmutationen eine Zunahme der Sicherheit bei der Differenzierung zwischen Wild- und Hausschweinen bedeutet.

Tabelle 42: Auswertung der RFLP-Analytik mit *Tsp509I*.

Dargestellt ist die Häufigkeit des Auftretens eines Restriktionsmusters bei Haus- und Wildschweinen.

Muster	Wildschweinproben	Anteil	Hausschweinproben	Anteil
kein Schnitt	10	42 %	0	
A	7	29 %	2	50 %
B	7	29 %	0	
C	0		1	25 %
D	0		1	25 %
Gesamt:	24		4	

Tabelle 43: Auswertung der RFLP-Analytik mit *BfaI*.

Dargestellt ist die Häufigkeit des Auftretens eines Restriktionsmusters bei Haus- und Wildschweinen.

Muster	Wildschweinproben	Anteil	Hausschweinproben	Anteil
kein Schnitt	0		1	25 %
A	0		1	25 %
B	20	83 %	0	
C	4	17 %	2	50 %
Gesamt:	24		4	

Die Gesamtgröße der mit *BfaI* entstehenden Fragmente einer Probe ist deutlich größer als die des ursprünglichen Amplifikats. Da es sich um einen mitochondrialen DNA-Bereich handelt, sind keine Allele vorhanden, welche die zusätzlichen Banden durch das Schneiden nur eines Allels erklären würde. Ferner ist die Summe der Länge der Restriktionsfragmente größer als die Länge des nicht geschnittenen Amplifikats. Bei einem regulären Schnittverhalten ist zu erwarten, dass alle Fragmente in gleicher Anzahl entstehen. Durch Ethidiumbromid wird die DNA auf den Agarosegelen sichtbar gemacht, wobei die Intensität einer Bande sowohl von der Anzahl der Fragmente als auch von deren Größe abhängig ist. Daher müsste bei gleicher Teilchenzahl pro Fragment die Intensität von dem größten zum kleinsten Fragment hin abnehmen. Auf Abbildung 49 ist zu sehen, dass die 500 Bp-Banden eine geringere Intensität als die 400 Bp-Banden haben. Es handelt sich daher offenbar um einen unvollständigen Verdau eines bereits geschnittenen Fragments. Die Erhöhung der Enzymmenge und Verlängerung der Restriktionsdauer sowie eine Verringerung der eingesetzten DNA-Menge zeigte eine Abnahme der Intensität von unvollständig geschnittenen Banden.

5 TYROSINASE-GEN

5.1 PCR

Für die Amplifikation des Tyrosinase-Gens (*tyr*-Gen) wurden vier Primer entwickelt, die 699 Bp des 765 Bp langen Gens amplifizieren (Abbildung 51). Die Amplifikate überlappen in der Mitte an einem 94 Bp langen Abschnitt. Für die Amplifikation eines größeren Bereichs des *tyr*-Gens wurden keine geeigneten Primerpaare gefunden. Die an das *tyr*-Gen angrenzenden DNA-Sequenzen waren nicht bekannt, so dass die Primer nicht außerhalb des Gens angelegt werden konnten.

Die PCR-Bedingungen, insbesondere die Annealingtemperatur, wurden optimiert (Abbildung 52). Bei allen Temperaturen und Proben entstehen Amplifikate der Größe um 400 Bp. Bei den Primern Tyr 1f/3r ist bei einer Annealintemperatur von 52 °C bei beiden Proben eine weitere Bande der Größe 250 Bp vorhanden, die bei Probe 1 nur sehr schwach ist. Bei allen weiteren Temperaturen entsteht nur ein Amplifikat.

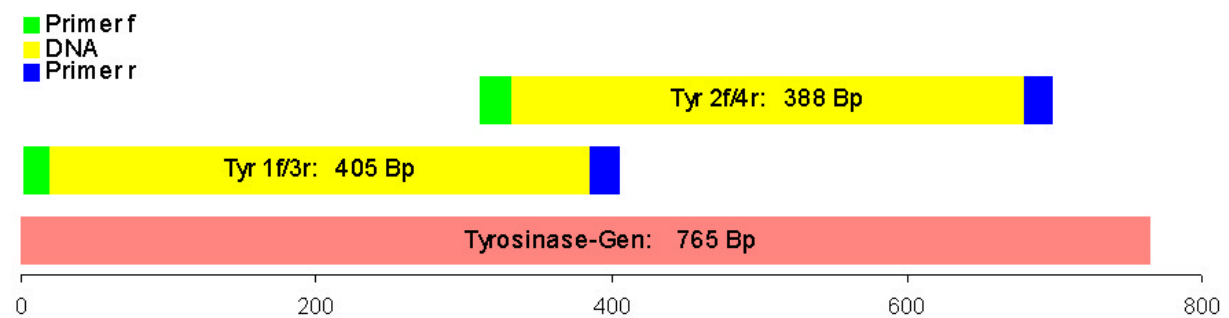


Abbildung 51: Lage der Primer im *tyr*-Gen.

699 Bp des 765 Bp großen Gens wird mit zwei Primerpaaren amplifiziert.

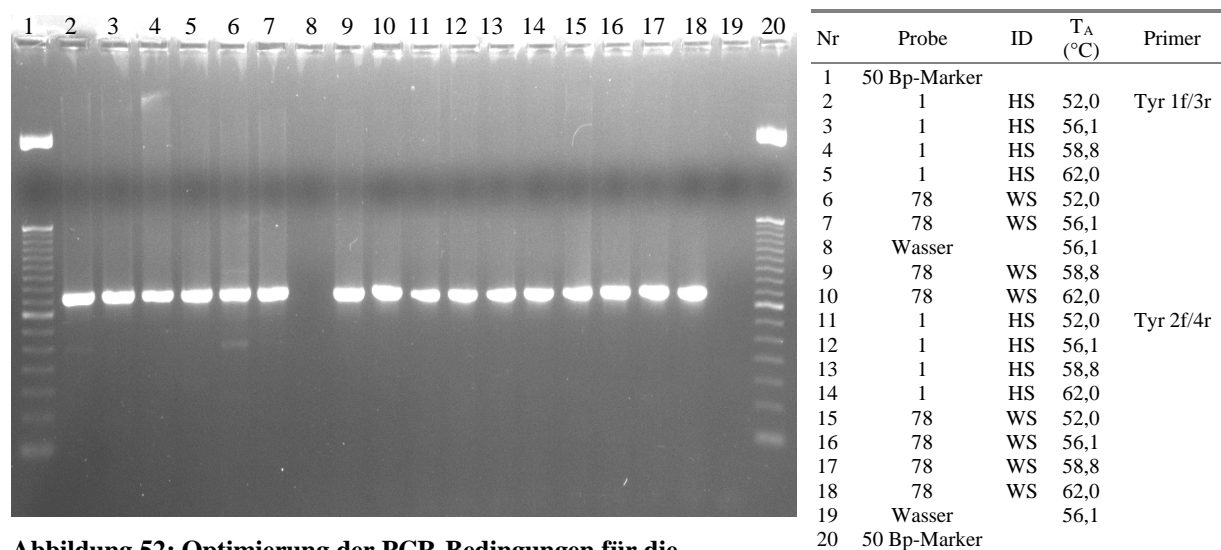


Abbildung 52: Optimierung der PCR-Bedingungen für die Amplifikation des *tyr*-Gens.

Bei niedrigen Annealingtemperaturen (T_A) entstehen durch unspezifische Bindungen weitere Banden.

Die Zusammensetzung des Ansatzes der PCR mit den Primerpaaren Tyr 1f/3r und Tyr 2f/4r ist in Tabelle 44 aufgeführt, das optimierte PCR-Temperaturprogramm in Tabelle 45.

Tabelle 44: Ansatz für die PCR mit Tyr-Primern pro Ansatz á 25 µl.

Substanz	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen
Wasser	-	-	14,35 µl
Puffer 10-fach	10 µmol/l	1 µmol/l	2,5 µl
Magnesiumchlorid	25 mmol/l	2 mmol/l	2,0 µl
Glycosylase	1 U	0,02 U	0,5 µl
dNTPs	2,5 mmol/l	0,2 mmol/l	2,0 µl
Primer 1	20 µmol/l	0,5 µmol/l	0,625 µl
Primer 2	20 µmol/l	0,5 µmol/l	0,625 µl
Polymerase: AmpliTaq Gold™	5 U	2 U	0,4 µl
DNA-Extrakt	-	-	2,0 µl
Gesamtvolumen	-	-	25 µl

Tabelle 45: Temperaturprogramm für die PCR mit Tyr-Primern.

Die optimale Anlagerungstemperatur bei beiden Primersystemen liegt bei 58 °C.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Zyklen
Uracil-Glycosylase-Aktivität	5:00	50	35
Aktivierung und Aufschmelzen	8:00	95	
Denaturierung	0:30	95	
Primer-Anlagerung	0:30	58	
Fortführung	0:30	72	
Vervollständigung	8:00	72	
Pause	∞	4	

5.2 Sequenzierung

Das *tyr*-Gen wurde mit den beiden äußeren Primern Tyr 1f und Tyr 4r für die Sequenzierung amplifiziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Sequence Navigator von ABI. Die Sequenzen der *forward* und *reverse*-Stränge des 699 Bp langen Amplifikats wurden bei jeder Probe mit der Funktion „Overlap“ aneinander ausgerichtet und eine Consensus-Sequenz (Cons.) erstellt. Die Consensus-Sequenzen der sequenzierten Proben wurden mit der Funktion „Align/Clustal“ aneinander ausgerichtet. Über die Funktion „Sequences/Create Shadow(s)/Compute Unambiguity Sequence“ wurden die Sequenzen miteinander verglichen und Sequenzgleichheit mit „-“, Sequenzunterschiede mit „*“ in den weiteren Zeile dargestellt (Abbildung 53 und Abbildung 54). Die Zeile „Vergl. HS“ zeigt die Sequenzunterschiede zwischen den Sequenzen der Hausschweinproben, die Zeile „Vergl. WS“ die Unterschiede zwischen den Sequenzen der Wildschweinproben und die Zeile „Vergl. HS-WS“ die Unterschiede der Sequenzen zwischen Haus- und Wildschweinen. Basis für den letzten Vergleich sind die jeweils aus den Wild- und Hausschweinproben generierten übereinstimmenden Sequenzen „Cons. HS“ bzw. „Cons. WS“.

Zur Sequenzierung wurden einige Proben ausgewählt, die verschiedenen Rassen angehören bzw. aus verschiedenen geographischen Regionen stammen und im *cytB*-Gen sowie im *mclr*-Gen stärkere Unterschiede aufweisen.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Tyr-1cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-5cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-6cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-23cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-48cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-52cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-62cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-66cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-78cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-130cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-139cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Tyr-140cons	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Vergl. HS	-----*								
Vergl. WS									
Cons. HS	GAGTGTGTG+	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Cons. WS	GAGTGTGTGA	CTCAATTAAC	AAGCTCAAAAC	AGACCTTGTG	AGAACTAGAG	GAAGAATGCT	CCTGGCTGCT	TTGTACTGCC	TGCTCTGGAC
Vergl. HS-WS	-----*								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Tyr-1cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-5cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-6cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-23cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-48cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-52cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-62cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-66cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-78cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-130cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-139cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Tyr-140cons	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Vergl. HS									
Vergl. WS									
Cons. HS	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Cons. WS	TTTCCAGACT	TCCGCCGGAC	ACTTCCCTCG	AGCCTGTGCC	TCCTCCAAGA	ACCTGATGGA	GAAGGAATGC	TGCCACCCCT	GGGGAGGTGA
Vergl. HS-WS									
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
Tyr-1cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-5cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-6cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-23cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-48cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-52cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-62cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-66cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-78cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-130cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-139cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Tyr-140cons	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Vergl. HS									
Vergl. WS									
Cons. HS	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Cons. WS	TGGGAGTCCC	TGTGGCCAGC	TCTCAGGCAG	GGGTTCTGTG	CAGGACATCA	TTCTGTCCAA	GGCACCCCTG	GGACCTCAST	TCCCTTTCAC
Vergl. HS-WS									
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
Tyr-1cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-5cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-6cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-23cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-48cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-52cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-62cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-66cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-78cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-130cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-139cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Tyr-140cons	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Vergl. HS	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Vergl. WS	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Cons. HS	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Cons. WS	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG
Vergl. HS-WS	CGGGGTGGAT	GAACGGGAST	CTTGGCCCTC	CGTCTTTTAT	AACAGGACCT	GCCAGTGCTT	TGGCAACTTC	ATGGGATTTA	ACTGTGGAAAG

Abbildung 53: Sequenzvergleich Teil a zwischen Haus- und Wildschweinen im *tyr*-Gen.

Aufgeführt sind die Hausschweinproben (1, 5, 139, 139 und 140) und Wildschweinproben (6, 23, 48, 52, 62, 66, 78). In diesem Abschnitt sind zwei Basensubstitutionen und eine heterozygote Situation an Position 310 zu erkennen.

ERGEBNISSE
TYROSINASE-GEN

	370	380	390	400	410	420	430	440	450
Tyr-1cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-5cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-6cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-23cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-48cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-52cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-62cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-66cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-78cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-130cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-139cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Tyr-140cons	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Vergl. HS	-----	-----	-----	*	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	*ACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Cons. WS	TTGTAAGTTT	GGCTTTTCAGG	GACCCAACTG	CACAGAGAGG	CGACTTTTGG	TCAGAAGAAA	CATCTTTGAT	TTGAGTGTGC	CAGAGAAGAA
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	*	-----	-----	-----	-----	-----
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
Tyr-1cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-5cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-6cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-23cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-48cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-52cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-62cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-66cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-78cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-130cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-139cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Tyr-140cons	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TA*GGCCAAA	TGAATAATGG
Cons. WS	CAAAATTTCTT	GCCTACCTCA	CTTTAGCGAA	ACATACTACC	AGCCCAGACT	TCGTCATCCC	CACAGGCACC	TACGGCCAAA	TGAATAATGG
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---*	-----
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
Tyr-1cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-5cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-6cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-23cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-48cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-52cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-62cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-66cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-78cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-130cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCTAGG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-139cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Tyr-140cons	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCTAGG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCTAGG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Cons. WS	ATCAACACCC	ATGTTTAGTG	ACATCAACAT	TTATGACCTC	TTTGTCTGGA	TGCATTATTA	CGTGTCAAAG	GACACACTAC	TTGGGGGCTC
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
Tyr-1cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-5cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-6cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-23cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-48cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-52cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-62cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-66cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-78cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-130cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-139cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tyr-140cons	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. HS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. HS	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cons. WS	TGAAATCTGG	AGAGACATTG	ATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vergl. HS-WS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 54: Sequenzvergleich Teil b zwischen Haus- und Wildschweinen im *tyr*-Gen.

Aufgeführt sind die Hausschweinproben (1, 5, 139, 139 und 140) und Wildschweinproben (6, 23, 48, 52, 62, 66, 78). In diesem Abschnitt sind drei Basensubstitutionen zu erkennen.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass zwischen den Hausschweinen im sequenzierten Bereich des *tyr*-Gens fünf Sequenzunterschiede auftreten, während zwischen den Wildschweinen kein Sequenzunterschied auftritt. Drei Sequenzunterschiede treten nur bei den Proben 130 und 140 auf, eine nur bei Probe 140. Bei den Mutationen an Position 310 des *tyr*-Gens findet sich bei den Wildschweinen 6, 48, und 62 eine heterozygote Situation mit den Basen C und T.

Bei Probe 130 ebenso wie bei Probe 1 und 5 handelt es sich um Hausschweine der Rasse Deutsche Landrasse, während es sich bei Probe 140 ebenso wie bei Probe 139 um die Rasse Piétrain handelt. Die vorhandenen Sequenzunterschiede sind weder innerhalb der Unterart noch innerhalb der Rassen einheitlich. Um die Auswirkungen der DNA-Sequenzänderungen auf die Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) zu beurteilen, wurde die DNA-Sequenz in die AS-Sequenz translatiert (Abbildung 55).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
AGTGTGTGACTCAATTACAGCTCAACAGACCTTGTGAGACTAGAGGAGAGATGCTCCTGGCTGCTTTGTACTGCCT
TCACACACTGAGTTAATTGTTGAGTTTGTCTGGACACTCTTGATCTCCTTCTTACGAGGACCGACGAACATGACGGA
S V * L N * Q A Q T D L V R T R G R M L L A A L Y C L>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      90      100     110     120     130     140     150     160
GCTCTGGACTTTCCAGACTTCCGCCGACACTTCCCTCGAGCCTGTGCCTCCTCCAGACCTGATGGAGAGGAGATGCT
CGAGACCTGAAGGTCTGAGGCGCGCTGTGAGGGAGCTCGAGACCGGAGGAGGTTCTTGGACTACCTCTTCTTACGA
L W T F Q T S A G H F P R A C A S S K N L M E K E C>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      170     180     190     200     210     220     230     240
GCCCACCTGGGGAGGTGATGGGAGTCCCTGTGGCCAGCTCTCAGGCAGGGGTTCTGTGAGGACATCATTCTGTCCAG
CGGGTGGGACCCCTCCACTACCTCAGGGACACCGGTGAGAGTCCGTCCCAAGGACAGTCTGTAGTAGACAGGTTCC
C P P W G G D G S P C G Q L S G R G S C Q D I I L S K>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      250     260     270     280     290     300     310     320
GCACCCCTGGGACCTCAGTTCCCTTCACCGGGGTGGATGACGGGAGTCTTGGCCCTCCGTCTTTTAAACAGGACCTG
CGTGGGACCTGGAGTCAAGGGGAGTGGCCCCACCTACTTGCCTCAGACCGGGAGGACAGAAATATTGTCTGGAC
A P L G P Q F P F T G V D E R E S W P S V F X N R T C>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      330     340     350     360     370     380     390     400
CCAGTGCTTTGGCACTTCATGGGATTTAACTGTGGAGTTGTAGTTTGGCTTTCAGGGACCCAACTGCACAGAGAGGC
GGTCACGAACCGTTGAAGTACCCTAAATTGACACCTTCAACATTCGAACCGAAGTCCCTGGGTTGACGTGTCTCTCCG
Q C F G N F M G F N C G S C K F G F Q G P N C T E R>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      410     420     430     440     450     460     470     480
GACTTTTGGTCAGAGAGACATCTTTGATTTGAGTGTGCCAGAGAGAACAAATTTCTTGCCTACCTCACTTTAGCGAAA
CTGAACACAGTCTTCTTTGTAGAACTAACTCACACGGTCTCTTCTTGTTTAAGACGGATGGAGTGAATCGCTTT
R L L V R R N I F D L S V P E K N K F L A Y L T L A K>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      490     500     510     520     530     540     550     560
CATACTACCAGCCAGACTTCGTATCCCCACAGGCACCTACGGCCAAATGAATATGGATCACACCCATGTTTAGTGA
GTATGATGGTGGGTCTGAAGCAGTAGGGGTGTCGGTGGATGCCGGTTTACTTATTACCTAGTTGTGGGTACAATCACT
H T T S P D F V I P T G T Y G Q M N N G S T P M F S D>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      570     580     590     600     610     620     630     640
CATCACATTTATGACCTCTTTGTCTGGATGCATTATTACGTGTCAGGGGACACACTACTTGGGGGCTCTGAATCTGGA
GTAGTTGTAATACTGGAGAACAGACCTACGTAATATGCACAGTTCCCTGTGTGATGAACCCCGAGACTTTAGACCT
I N I Y D L F V W M H Y Y V S R D T L L G G S E I W>
      _____TRANSLATION OF TYR-GANZ-6 [A]_____

      650
GAGACATTGATT
CTCTGTAACAA
R D I D I
_____TRANSLATI

```

Abbildung 55: Translation der DNA-Sequenz des *tyr*-Gens von Probe 6 in die Aminosäuresequenz.
Mit Pfeilen markiert sind die fünf detektierten Polymorphismen.

Die DNA-Codons der vier identifizierten Sequenzvarianten sind mit den AS, für die sie codieren, in Tabelle 46 aufgeführt. Variante 1 wurde bei den Haus- und Wildschweinproben 1, 5, 23, 52, 66 und 139 gefunden, Variante 2 bei den Wildschweinproben 6, 48 und 62, Variante 3 bei Hausschwein 130 und Variante 4 bei Hausschwein 140. Die Tabelle zeigt, dass es sich bei allen Sequenzunterschieden um Wobble-Positionen handelt, also um die dritte Position des Triplets, deren hier vorhandener Austausch nicht zu einer Änderung der AS-Sequenz führt. Die AS-Sequenz des sequenzierten Abschnitts des *tyr*-Gens von allen Proben ist daher identisch.

Tabelle 46: Sequenzvarianten im *tyr*-Gen und deren Auswirkung auf die Aminosäure-Sequenz.
Für die vier identifizierten Sequenzvarianten sind die Codons und die daraus codierte AS an den Nukleotidpositionen mit Polymorphismen angegeben. Keine der nachgewiesenen Mutationen führt zu einer Veränderung der AS-Sequenz.

Sequenz-varianten	Nukleotid-Position									
	8-10		308-310		389-391		521-523		605-607	
	Codon	AS	Codon	AS	Codon	AS	Codon	AS	Codon	AS
1	TGA	Stopp	TAT	Tyrosin	TGC	Cytosin	TAC	Tyrosin	TCA	Serin
2	TGA	Stopp	TAT TAC	Tyrosin	TGC	Cytosin	TAC	Tyrosin	TCA	Serin
3	TGG	Stopp	TAC	Tyrosin	TGC	Cytosin	TAT	Tyrosin	TCT	Serin
4	TGG	Stopp	TAC	Tyrosin	TGG	Cytosin	TAT	Tyrosin	TCT	Serin

6 IMMUNOREZEPTOR DAP10-GEN

6.1 PCR

Die Sequenz des Immunorezeptor DAP10-Gens (*dap10-Gen*) erstreckt sich über 1338 Bp, wobei der nur 265 Bp lange Protein-codierende Abschnitt in vier Exons (39..81, 463..486, 941..1072, 1298..1338) aufgeteilt ist (GenBank-Accession-No.: AF285446). Nach einem Übergang von 152 Bp folgt das Immunorezeptor DAP12-Gen (*dap12-Gen*) in umgekehrter Transkriptionsrichtung (Yim *et al.*, 2001).

Für die Amplifikation wurden sechs Primer entwickelt, die 1709 Bp des Gens amplifizieren (Abbildung 56). Die Amplifikate überlappen um mehr als 50 Bp. Für die Amplifikation der äußeren Bereiche des *dap10*-Gens wurden keine geeigneten Primerpaare gefunden. Die an das *dap10*-Gen angrenzenden DNA-Sequenzen waren nicht bekannt, so dass die Primer nicht außerhalb des Gens angelegt werden konnten.

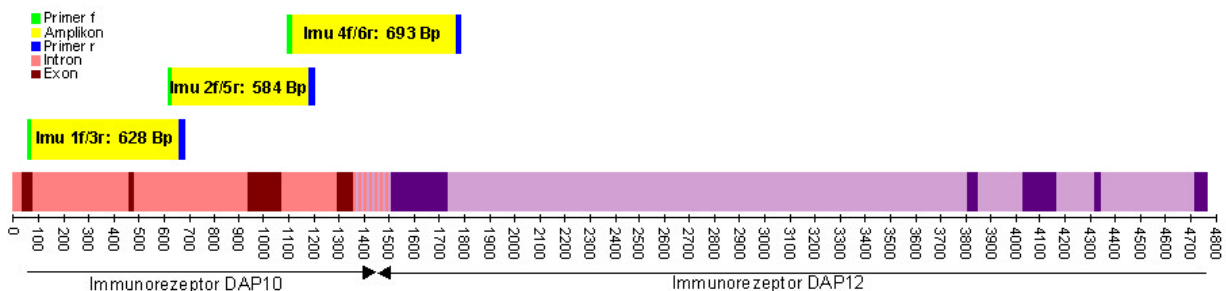


Abbildung 56: Lage der Primer und Amplifikate im *dap10*-Gen.

Das 265 Bp lange Gen wird von drei Introns unterbrochen und schließt an das *dap12*-Gen an, das in umgekehrter Transkriptionsrichtung im Genom liegt (Yim *et al.*, 2001). Bis auf den Primer Imu 1f binden alle Primer in den Introns.

Die PCR-Bedingungen, insbesondere die Annealingtemperatur, wurden optimiert. Bei allen Temperaturen und Proben entstehen Amplifikate der erwarteten Größe. Die optimale Annealing-Temperatur wurde bei Imu 1f/3r mit 55 °C, bei Imu 2f/5r mit 60 °C und bei Imu4f/6r mit 58 °C bestimmt. Die Zusammensetzung des Ansatzes der PCR mit den Imu-Primerpaaren ist in Tabelle 47 aufgeführt, das optimierte PCR-Temperaturprogramm in Tabelle 48.

Tabelle 47: Ansatz für die PCR mit Imu-Primern pro Ansatz á 25 µl.

Substanz	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen
Wasser	-	-	15,7 µl
Puffer 10-fach	10 µmol/l	1 µmol/l	2,5 µl
Magnesiumchlorid	25 mmol/l	2 mmol/l	2,0 µl
dNTPs	2,5 mmol/l	0,2 mmol/l	2,0 µl
Primer 1	20 µmol/l	0,2 µmol/l	0,25 µl
Primer 2	20 µmol/l	0,2 µmol/l	0,25 µl
Polymerase: AmpliTaq Gold™	5 U	1,5 U	0,3 µl
DNA-Extrakt	-	-	2,0 µl
Gesamtvolumen	-	-	25 µl

Tabelle 48: Temperaturprogramm-Zeit-Programm für die PCR mit Imu-Primern.
Die optimale Anlagerungstemperatur ist bei allen drei Primersystemen unterschiedlich.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Zyklen
Aktivierung und Aufschmelzen	10:00	95	35
Denaturierung	0:30	95	
Primer-Anlagerung	0:30	Imu 1f/3r = 55 °C	
		Imu 2f/5r = 60 °C	
		Imu 4f/6r = 58 °C	
Fortführung	0:30	72	
Vervollständigung	7:00	72	
Pause	∞	4	

Unter den oben genannten Bedingungen konnte durch die PCR mit allen Primersystemen bei der extrahierten DNA der untersuchten Proben ein PCR-Amplifikat erhalten werden. Bei dem Primersystem Imu 4f/6r entstanden trotz Variierung der Magnesiumchloridkonzentration sowie des Temperatur-Zeit-Programms für die PCR nur schwache Banden. Ein Vergleich der DNA-Sequenz des Imu-4f-Primers mit dem sequenzierten Bereich des Abschnitts Imu2f/5r zeigt eine vollständige Übereinstimmung mit allen sequenzierten Proben. Die Sequenz des reverse-Primers Imu-6r, die bereits im anliegenden *dap12*-Gen liegt, konnte nicht geprüft werden. Auf die Durchführung einer Sequenzierungs-Reaktion des Imu 4f/6r-Bereichs wurde daher verzichtet.

6.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit den oben beschriebenen Primern jeweils in sense und antisense-Richtung. Die sense- und antisense-Sequenzen wurden miteinander verglichen und in einer Consensus-Sequenz zusammengeführt. Die Consensus-Sequenzen der verschiedenen Haus- und Wildschweine sind in Abbildung 57 bis Abbildung 59 aneinander ausgerichtet und miteinander verglichen worden.

	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Imu1f3r-1	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
Imu1f3r-5	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
Imu1f3r-129	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
Imu1f3r-130	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
Imu1f3r-140	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
Imu1f3r-147	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
<i>Verf. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-32	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
Imu1f3r-34	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
Imu1f3r-62	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
<i>Verf. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
<i>Cons. WS</i>	GTGGTCGGGG	CGGGGGGGCC	GGGCTGTGTG	TTAGGCAAGT	TTTGTAAAAG	GGACAGCTTG	GGTGGCATCT	GAAGTGAGGG	GTGCTAAGGG
<i>Verf. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
Imu1f3r-1	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
Imu1f3r-5	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
Imu1f3r-129	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
Imu1f3r-130	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
Imu1f3r-140	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
Imu1f3r-147	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
<i>Verf. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-32	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
Imu1f3r-34	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
Imu1f3r-62	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
<i>Verf. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
<i>Cons. WS</i>	CAGGTCCTTC	TCCCAGCACC	CCCCTCCCAT	GTAGGCTTCT	GGGCTTGGTG	CTTTGGGGAG	GGAAGCTGGG	TTTGGAAATGG	CCACCTGTTT
<i>Verf. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
Imu1f3r-1	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
Imu1f3r-5	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
Imu1f3r-129	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
Imu1f3r-130	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
Imu1f3r-140	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
Imu1f3r-147	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
<i>Verf. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-32	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
Imu1f3r-34	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
Imu1f3r-62	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
<i>Verf. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
<i>Cons. WS</i>	TTCTTCTTCT	CACGCTGAG	TTTCGGTCTC	TACTTCTGGG	TTTCTGTCTC	TCTGTGTCTC	GGGGGGCTCC	CCTCCCGTTT	GGCCCCCTTT
<i>Verf. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 57: DNA-Sequenz des Amplifikats der Primer Imu 1f/3r.

In diesem Abschnitt sind alle untersuchten Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen) und Wildschweinen (unten) identisch.

ERGEBNISSE
IMMUNOREZEPTOR DAP10-GEN

	370	380	390	400	410	420	430	440	450
Imu1f3r-1	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
Imu1f3r-5	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
Imu1f3r-129	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
Imu1f3r-130	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
Imu1f3r-140	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
Imu1f3r-147	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-32	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
Imu1f3r-34	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
Imu1f3r-62	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
<i>Fergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
<i>Cons. WS</i>	TGCGATTGCA	TCTCTCCAGA	GTGGACATTA	CTTCTGAAGA	CATCACCTTT	TCCTTTGGGA	ACCTCCTCTC	CCTGCTGATC	TATCTTCCCT
<i>Fergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
Imu1f3r-1	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	AAGCGACTTC	AGGTACTGCT
Imu1f3r-5	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	CAGCGACTTC	AGGTACTGCT
Imu1f3r-129	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	CAGCGACTTC	AGGTACTGCT
Imu1f3r-130	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	CAGCGACTTC	AGGTACTGCT
Imu1f3r-140	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	CAGCGACTTC	AGGTACTGCT
Imu1f3r-147	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	AAGCGACTTC	AGGTACTGCT
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*	-----
Imu1f3r-32	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	CAGCGACTTC	AGGTACTGCT
Imu1f3r-34	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	AAGCGACTTC	AGGTACTGCT
Imu1f3r-62	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	CAGCGACTTC	AGGTACTGCT
<i>Fergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*	-----
<i>Cons. HS</i>	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	*AAGCGACTTC	AGGTACTGCT
<i>Cons. WS</i>	ATCCTTCCAC	AGTGGCTGCA	GCGCAGGTGA	CCTCAGGTGA	GAAATCAACA	CCCTTTTCCC	TTTGTGGAGC	*AAGCGACTTC	AGGTACTGCT
<i>Fergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	*	-----
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
Imu1f3r-1	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
Imu1f3r-5	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
Imu1f3r-129	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
Imu1f3r-130	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
Imu1f3r-140	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
Imu1f3r-147	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-32	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
Imu1f3r-34	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
Imu1f3r-62	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTGCGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
<i>Fergl. WS</i>	-----	-----	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTG*GGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
<i>Cons. WS</i>	TCCTTCCCCC	CGCTGCCCCA	AAAGTG*GGCC	TGACATTCCT	GGAACACCCC	CAGCGGCTCT	CCAGGTCACC	ATCTGACCTC	CCATCCCCAA
<i>Fergl. HS-WS</i>	-----	-----	*	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
Imu1f3r-1	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-5	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-129	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-130	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-140	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-147	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-32	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-34	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu1f3r-62	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Fergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. WS</i>	ATCGGAGGCT	CCAAAGGACC	CACAGCCCTC	TCTG-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Fergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 58: DNA-Sequenz des Amplifikats der Primer Imu 1f/3r.

An Nukleotid-Position 521 und 566 sind bei Haus- (obere Sequenzen) und Wildschweinen (unten) gleichermaßen Basenaustausche vorhanden.

ERGEBNISSE IMMUNOREZEPTOR DAP10-GEN

	680	690	700	710	720	730	740	750	760
Imu2f5r-1	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
Imu2f5r-5	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
Imu2f5r-129	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
Imu2f5r-130	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
Imu2f5r-140	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
Imu2f5r-145	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu2f5r-32	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
Imu2f5r-34	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
Imu2f5r-64	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
<i>Cons. WS</i>	-----AT	TCTCATCACC	AAACAAGAGA	CCCAGGGACC	CAGCCACCCC	ACCCCCCGGA	GGCCTATCTT	CAGGGGTATC	CACCATGCCC
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	770	780	790	800	810	820	830	840	850
Imu2f5r-1	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
Imu2f5r-5	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
Imu2f5r-129	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
Imu2f5r-130	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
Imu2f5r-140	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
Imu2f5r-145	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu2f5r-32	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
Imu2f5r-34	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
Imu2f5r-64	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
<i>Cons. WS</i>	AGAGCACAGC	CCCTGGGGCC	TTGGGACACA	TCAGCCTGTC	TCTGGATCTC	CCCTCATTCG	CCAGGGAATC	TGGGCCACCC	AACCTCAAAG
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	860	870	880	890	900	910	920	930	940
Imu2f5r-1	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
Imu2f5r-5	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
Imu2f5r-129	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
Imu2f5r-130	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
Imu2f5r-140	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
Imu2f5r-145	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu2f5r-32	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
Imu2f5r-34	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
Imu2f5r-64	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
<i>Cons. WS</i>	GGACTTACTT	TGCCCCAAGC	CCAGCCACGA	GTGTCTGGAA	CCACACCCCTC	CCCGCCAGCC	ACCTTCTCAT	CTCGGCCCCA	ACCCTTCAGG
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030
Imu2f5r-1	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
Imu2f5r-5	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
Imu2f5r-129	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
Imu2f5r-130	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
Imu2f5r-140	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
Imu2f5r-145	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu2f5r-32	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
Imu2f5r-34	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
Imu2f5r-64	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
<i>Cons. WS</i>	TTCTCTGTTC	GGATGTGGGC	CCCTCTCCCT	GCCACTCCCTA	GCAGGCCCTCG	TGGCCGCTGA	TGCAGTTGTG	TCAGTGTAA	TCGTGGTGGG
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
Imu2f5r-1	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
Imu2f5r-5	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
Imu2f5r-129	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
Imu2f5r-130	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
Imu2f5r-140	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
Imu2f5r-145	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imu2f5r-32	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
Imu2f5r-34	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
Imu2f5r-64	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
<i>Cons. WS</i>	GGTATTTGTG	TGCGGACGCC	CACGCAGCAG	GCCACCCCAA	GGTGAGGGCA	GGGACGGGCT	GGGCTGAAG	AGGGTTGGTG	TCCTAGGGA
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210
Imu2f5r-1	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
Imu2f5r-5	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
Imu2f5r-129	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
Imu2f5r-130	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
Imu2f5r-140	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
Imu2f5r-145	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
<i>Vergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Imu2f5r-32	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
Imu2f5r-34	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
Imu2f5r-64	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
<i>Vergl. WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
<i>Cons. HS</i>	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
<i>Cons. WS</i>	GGGGGGTCCC	CAGGGCGGGG	GCCCCAGGGC	AAGCCCTGGA	GGTTCTGGGG	AAACCCCTGGG	GGCGGTGCTT	GGGGG	
<i>Vergl. HS-WS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Abbildung 59: DNA-Sequenz des Amplifikats der Primer Imu 2f/5r.

In diesem Abschnitt sind alle untersuchten Sequenzen von Haus- (obere Sequenzen) und Wildschweinen (unten) identisch.

In dem sequenzierten Abschnitt des *dap10*-Gens existieren nur zwei Polymorphismen. An Position 521 ist sowohl bei Haus- wie auch bei einem Wildschwein ein C-A -Transition und an Position 566 ebenfalls bei Haus- und Wildschweinen eine T-C-Transition. Diese Polymorphismen sind somit nicht Unterarten-charakteristisch. Die Mutationen liegen im Intron, so dass keine Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz auftreten.

7 MIKROSATELLIT S0602

Der Mikrosatellit S0602 wurde als repetetiver Bereich bei Säugetieren gefunden und in der Genbank veröffentlicht (Benson *et al.*, 2000; Accession No. AJ276455). Ein Vergleich zwischen den Sequenzen verschiedener Arten oder Rassen war nicht möglich, da nur eine Sequenz veröffentlicht war. Für dieses System wurde dennoch ein PCR-System etabliert, da repetetive Bereiche hohe Mutationsraten aufweisen und damit für eine Differenzierung unterhalb der Artengrenze geeignet erscheinen.

7.1 PCR

Der Bereich des Mikrosatelliten S0602 wurde mit einem Primerpaar amplifiziert. Die Lage der Primer in diesem Bereich ist in Abbildung 60 dargestellt. Das optimierte PCR-Temperaturprogramm ist in der Tabelle 49, der verwendete PCR-Mastermix in Tabelle 50 aufgeführt.

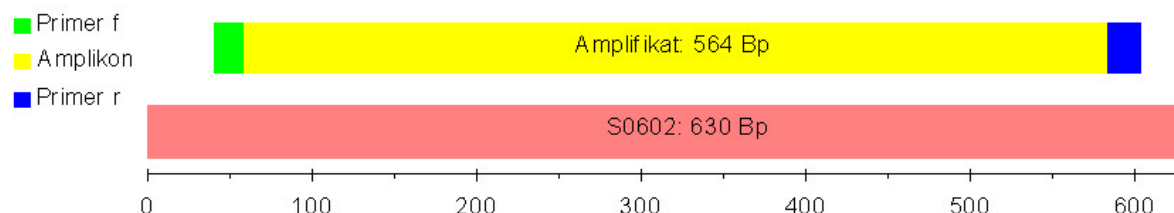


Abbildung 60: Lage der Primer und des entstehenden Amplifikats im Mikrosatelliten.

Das Amplikat umfasst 564 des 630 Bp großen Sequenzabschnitts. Die repetitiven Bereiche liegen vollständig zwischen den Primern.

Tabelle 49: Temperaturprogramm für die Amplifikation des S0602-Bereichs.

Die Anlagerungstemperatur beträgt 52 °C, der Fortführungsschritt wurde aufgrund der Optimierung auf 90 s, der abschließende Vervollständigungsschritt auf 10 min erhöht.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Zyklen
Aktivierung und Aufschmelzen	8:00	95	35
Denaturierung	0:30	95	
Primer-Anlagerung	0:30	52	
Fortführung	1:30	72	
Vervollständigung	10:00	72	
Pause	∞	4	

Tabelle 50: Mastermix für die PCR im Mikrosatelliten S0602.

Berechnet für ein Ansatzvolumen von 25 µl. Das Verhältnis von Primern zu dNTPs wurde im Zuge der Optimierung leicht zugunsten der dNTPs verschoben. Aufgeführt ist der optimierte Mastermix.

Substanz (Einheit)	Ausgangskonz.	Endkonz.	Menge pro Ansatz (µl)
Wasser			14,2
Puffer 10-fach (µmol/l)	10	1	2,5
Magnesiumchlorid (mmol/l)	25	2	2,0
dNTPs (mmol/l)	2,5	0,3	3,0
Primer 1 (µmol/l)	20	0,4	0,5
Primer 2 (µmol/l)	20	0,4	0,5
Polymerase: AmpliTaq Gold™ (U)	5	1,5	0,3
DNA-Extrakt (pmol/l)			2
Gesamtvolumen			25

7.2 Sequenzierung

Der S0602-Bereich von einigen Haus- und Wildschweinproben wurde mit dem 310 Genetic Analyzer ABI Prism™ sequenziert. Die Sequenzen wurden aneinander ausgerichtet und miteinander verglichen. Dies ist Abbildung 61 und Abbildung 62 dargestellt.

	70	80	90	100	110	120	130	140	150
MS1f2r-1	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CACCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-5	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CACCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-129	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CACCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-130	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CACCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-140	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-145	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-147	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CACCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
<i>Fergl. HS</i>	-----	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-32	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-34	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-62	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
MS1f2r-64	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
<i>Fergl. WS</i>	-----	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
<i>Cons. HS</i>	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
<i>Cons. WS</i>	-----GT	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
<i>Fergl. HS-WS</i>	-----	GAATTTAAATT	GTAATTTTPTT	CTCTCTGTAG	ATTCTAAATTG	GAGACTAAAA	ACTGTTTGACA	GCCTCTTCCT	ATCAAGGAAC
	160	170	180	190	200	210	220	230	240
MS1f2r-1	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-5	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-129	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-130	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-140	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-145	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-147	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
<i>Fergl. HS</i>	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-32	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-34	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-62	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
MS1f2r-64	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
<i>Fergl. WS</i>	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
<i>Cons. HS</i>	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
<i>Cons. WS</i>	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
<i>Fergl. HS-WS</i>	GTGAGCTTAA	TTCAGTGGTA	AAGCGATGTG	ACCTCCATTA	TATATAGGAA	TAATTTATTC	ATACCCCTTG	TCCAGGGCAG	GTAGGGAAAT
	250	260	270	280	290	300	310	320	330
MS1f2r-1	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-5	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	A-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-129	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	A-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-130	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACA--GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-140	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	A-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-145	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	A-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-147	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
<i>Fergl. HS</i>	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-32	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACA--GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-34	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	A-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-62	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACA--GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
MS1f2r-64	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
<i>Fergl. WS</i>	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
<i>Cons. HS</i>	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
<i>Cons. WS</i>	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG
<i>Fergl. HS-WS</i>	AGATTTTACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	-----GAGTA	ATCACAAGG	GAACAACATG	GGCAACCTAG

Abbildung 61: Sequenzvergleich zwischen Haus- und Wildschweinfleisch im Bereich des Mikrosatelliten S0602, Teil a.

Bei den Sequenzvergleichen bedeutet ein „*“, dass an dieser Nukleotidposition Unterschiede zwischen den Tieren bestehen, während ein „-“ Sequenzgleichheit anzeigt. Ein „-“ innerhalb der Sequenz einer Probe bedeutet, dass hier eine Deletion gegenüber den anderen Tieren bzw. bei den anderen eine Insertion vorliegt. Der mit einem Kasten gekennzeichnete repetitive Bereich besteht aus Wiederholungen der Sequenzfolge „CACA“.

ERGEBNISSE
MIKROSATELLIT S0602

	340	350	360	370	380	390	400	410	420
MS1f2r-1	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-5	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-129	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-130	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-140	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTTCTCTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-145	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTTCTCTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-147	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MS1f2r-32	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTTCTCTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-34	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-62	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTTCTCTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
MS1f2r-64	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTTCTCTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
<i>Cons. HS</i>	TGTTAGAAAA	GAGGAGAGAT	TCAATTGTAA	TTTGTACATG	TTCTCTTAAA	TATTTTITAG	CTCCGACAA	TGTTTCCATG	ACTTAGATTC
<i>Fergl. HS-HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	430	440	450	460	470	480	490	500	510
MS1f2r-1	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	AAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	CGCCCTTTAC
MS1f2r-5	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	AAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	CGCTCTTTAC
MS1f2r-129	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	AAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	CGCTCTTTAC
MS1f2r-130	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	AAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	CGCTCTTTAC
MS1f2r-140	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	AAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	CGCTCTTTAC
MS1f2r-145	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	GAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	TGCTCTTTAC
MS1f2r-147	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	AAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	CGCCCTTTAC
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MS1f2r-32	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	GAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	TGCTCTTTAC
MS1f2r-34	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	AAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	TGCTCTTTAC
MS1f2r-62	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	GAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	TGCTCTTTAC
MS1f2r-64	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	GAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	TGCTCTTTAC
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	GAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	CGCTCTTTAC
<i>Cons. HS</i>	AATCATTTGA	TCCTAATTTT	TGCTGGAAAA	TCAAAATAAA	GAAGAAATAA	TTTAATTTGC	TGACTGTGCT	GTATGAACAT	TGCTCTTTAC
<i>Fergl. HS-HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	520	530	540	550	560	570	580	590	600
MS1f2r-1	GTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-5	GTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-129	GTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-130	GTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-140	ATTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-145	ATTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-147	GTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MS1f2r-32	ATTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-34	ATTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-62	ATTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
MS1f2r-64	ATTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
<i>Fergl. HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Cons. HS</i>	gTTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
<i>Cons. HS</i>	gTTATCCAAA	TCCAAAATCT	CTGCCACATG	ATGGGGAAAT	TAAATTTTCT	CATTGTTAAA	AAATCATCAG	AATAATTCAG	CACCATGC
<i>Fergl. HS-HS</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 62: Sequenzvergleich zwischen Haus- und Wildschweinfleisch im Bereich des Mikrosatelliten S0602, Teil b.

Bei den Sequenzvergleichen bedeutet ein „*“, dass an dieser Nukleotidposition Unterschiede zwischen den Tieren bestehen, während ein „-“ Sequenzgleichheit anzeigt. In diesem Abschnitt befinden sich keine Insertionen und keine repetitiven Elemente.

Am auffälligsten sind die Sequenzunterschiede zwischen Position 248 und 295 des S0602-Bereichs, in dem die Basenfolge „CA“ unterschiedlich oft wiederholt wird. Die kleinste Anzahl an Wiederholungen sind 20 bei Hausschwein 1 und 147. Um vier Basen also zwei Wiederholungen länger ist dieser Bereich bei den Hausschweinen 5, 129, 140, 145 sowie beim Wildschwein 34. Weitere vier Basen länger ist die Sequenz beim Hausschwein 130, sowie den Wildschweinen 32, 62 und 64 (Tabelle 51). Diese Wildschweine weisen weiterhin eine C-A Substitution an Position 264 des Mikrosatelliten auf. In dem nicht repetitiven Bereich dieses Mikrosatelliten wurden an 14 Basenpositionen Punktmutationen festgestellt, die in Tabelle 52 aufgeführt sind. An den Nukleotidpositionen 92, 501 und 511 ist die Sequenz der Wildschweine einheitlich, während die Sequenz mehrerer Hausschweine von diesen abweicht.

Tabelle 51: Repetitive Sequenz im Mikrosatelliten S0602.

Dargestellt ist die Anzahl der Repeats und die DNA-Sequenz. Die Wildschwein-Proben 32, 62 und 64 weisen an Position 264 eine C-A Substitution auf. Diese Proben haben außerdem 24 CA-Repeats. Nr. = Probennummer entsprechend Tabelle 12; Form: HS = Hausschwein, WS = Wildschwein.

Probe		Repeats	DNA-Sequenz des CA-Repeats
Nr.	Form	CA	
1	HS	20	CACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
5	HS	22	CACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
129	HS	22	CACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
130	HS	24	CA
140	HS	22	CACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
145	HS	22	CACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
147	HS	20	CACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
32	WS	24	CA
34	WS	22	CACACACACACACACACACACACACACACACACACACA
62	WS	24	CA
64	WS	24	CA

Tabelle 52: Sequenzunterschiede im Mikrosatelliten S0602.

An 15 Positionen gibt es Basenaustausche innerhalb und zwischen den Rassen der untersuchten Haus- und Wildschweine. Dargestellt sind die Basen, die im Vergleich zu der Sequenz von Probe Nr. 1 abweichen. Nr. = Probennummer entsprechend Tabelle 12; Form: HS = Hausschwein, WS = Wildschwein.

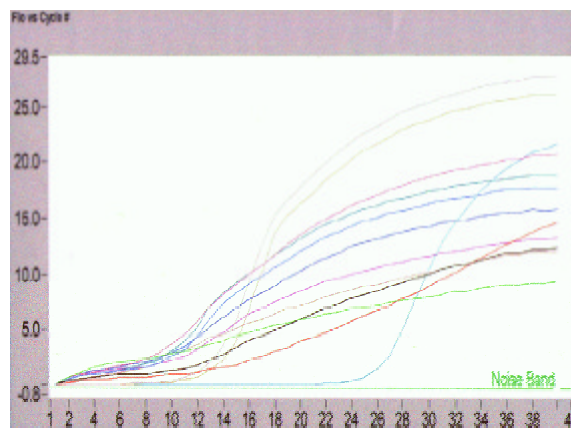
Probe		Base an Position														
Nr.	Form	84	92	98	149	170	223	225	264	373	429	461	478	501	504	511
1	HS	A	A	T	A	A	C	G	C	C	G	A	T	C	C	G
5	HS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
129	HS	G	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
130	HS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
140	HS	G	T	-	-	-	-	A	-	T	-	G	-	T	T	A
145	HS	G	T	-	G	G	-	-	-	T	-	G	-	T	T	A
147	HS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	WS	-	T	-	G	G	-	A	A	T	-	G	-	T	T	A
34	WS	G	T	-	G	G	T	-	-	-	C	-	G	T	-	A
62	WS	G	T	-	G	G	-	A	A	T	-	G	-	T	T	A
64	WS	G	T	-	-	-	-	A	A	T	-	G	-	T	T	A

Die Hausschweine 1 und 147 haben identische DNA-Sequenzen innerhalb des sequenzierten Bereichs des MS0602, die weiteren Haus- und Wildschweine weisen an mindestens einer Basenposition Unterschiede auf.

8 UNTERSUCHUNGEN MIT REAL-TIME-PCR-SYSTEMEN

Durch die Verwendung eines Real-Time-PCR-Systems ist es möglich, Punktmutationen während oder unmittelbar nach der PCR zu identifizieren, ohne eine zusätzliche Analyse, wie z.B. eine RFLP, durchführen zu müssen. Verwendet wurde das LightCycler™-System von Roche, bei dem durch den Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffs Sybr® Green I bzw. die Verwendung von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden die Zunahme der Amplifikate während der PCR kontrolliert werden kann (Abbildung 63). Am Ende der Reaktion wurde durch langsames Aufschmelzen der Amplifikate (0,1 °C/s) der Schmelzpunkt bestimmt. Bei Amplifikaten mit Cytb-Primern und mit D-Loop-Primern wurde der Schmelzpunkt der doppelsträngigen Amplifikate durch Sybr® Green I sichtbar gemacht. In einem weiteren Versuch wurde mit kurzen Amplifikaten des D-Loop-Bereichs der Schmelzpunkt zwischen dem Amplifikat und einer DNA-Sonde detektiert.

Fluoreszenz



PCR-Zyklen

Abbildung 63: Beobachtung der Fluoreszenzzunahme während der PCR im LightCycler®.

Der sigmoide Fluoreszenzverlauf ist proportional zu der Anzahl der entstandenen Amplifikate die durch Sonden oder Sybr® Green detektiert werden.

8.1 Schmelzpunktbestimmung mit Sybr® Green I bei Cytb 1f/2r-Amplifikaten

Tabelle 53: Reaktionsansatz für eine Real-Time-PCR mit Sybr® Green I auf dem LightCycler™.
Berechnet für ein Reaktionsvolumen von 20 µl. Verwendet wurde ein Ready-to-use-Gemisch, dem nur noch Primer, Magnesiumchlorid und die zu amplifizierende DNA zugesetzt werden mussten.

Substanz (Einheit)	Ausgangskonz.	Endkonz.	Menge pro Ansatz (µl)
Wasser			11,8
Ready-to-use Reaktionsgemisch	10	1	2
Magnesiumchlorid (mmol/l)	25	4	3,2
Primer 1 (µmol/l)	20	0,5	0,5
Primer 2 (µmol/l)	20	0,5	0,5
DNA-Extrakt (pmol/l)			2
Gesamtvolumen			20

Tabelle 54: Temperaturprogramm für die PCR mit den Primern Cytb 1f/2r im LightCycler™.
Im Anschluss an die für den LightCycler™ optimierte PCR folgt die Aufnahme einer Schmelzkurve durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung beim langsamen Aufheizen der Temperatur von 40 auf 94 °C.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Heizrate (°C/s)	Zyklen	Messungs-Modus
Aktivierung und Denaturierung	4:00	95	20	40	single
Denaturierung	0:10	95	20		
Anlagerung	0:15	55	20		
Fortführung	0:05	72	20		
Vervollständigung	1:00	72	20		
Schmelzkurve Start	0:01	40	0,1		continuos
Schmelzkurve Ende	0:01	94	20		-
Kühlung	0:30	40	20		-

Im Anschluss an die mit dem Sybr® Green I PCR-Kit am LightCycler™ durchgeführte PCR mit den Primern Cytb 1f und Cytb 2r wurde eine Schmelzkurve von 40 bis 94 °C aufgenommen (Abbildung 65). Es zeigen sich zwischen den verschiedenen Proben leicht unterschiedliche Schmelzpunkte.

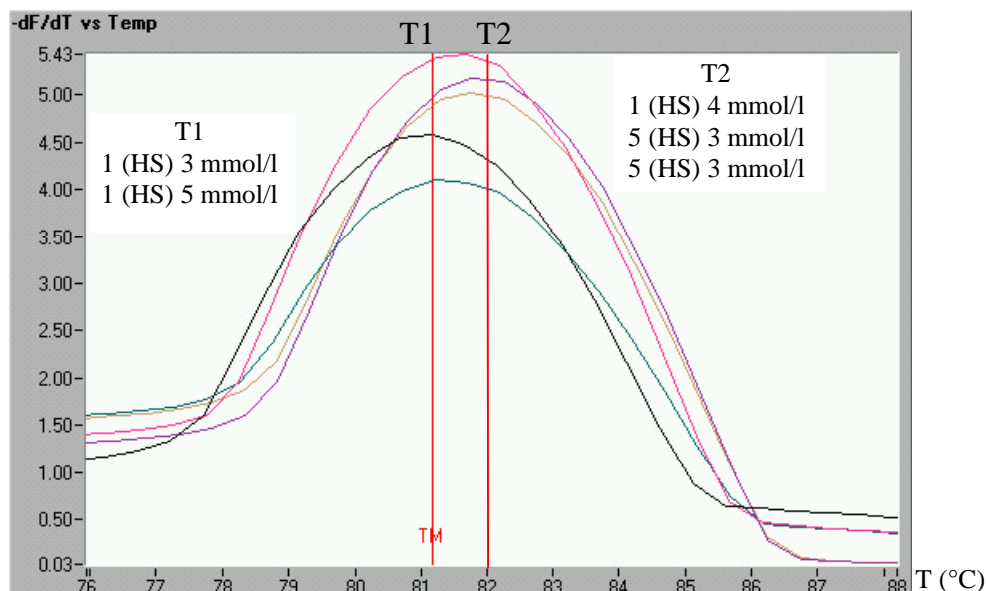


Abbildung 64: Schmelzkurven der Cytb 1f/2r-Amplifikate der Hausschweine 1 und 5 mit verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen.

Es treten bei der gleichen Probe unterschiedliche Schmelzpunkte bei Verwendung unterschiedlicher Magnesiumchloridkonzentrationen auf. Die Maxima aller Kurven liegen zwischen 81 und 82 °C.

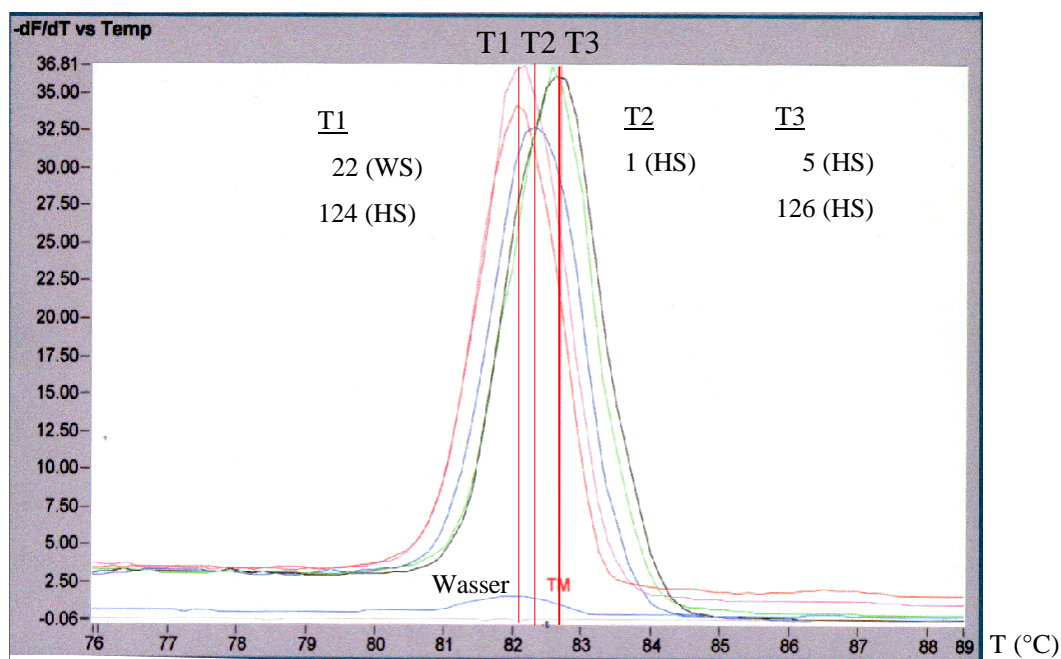


Abbildung 65: Schmelzpunktanalyse der Cytb 1f/2r-Amplifikate mit 4 mmol/l Magnesiumchlorid.

Es sind drei Gruppen mit verschiedenen Schmelzpunkten zu beobachten. Die Maxima der Schmelzkurven liegen zwischen 82 und 83 °C.

Abbildung 64 zeigt den Einfluss der Magnesiumchloridkonzentration auf den Schmelzpunkt der DNA. Die Schmelzpunkte der PCR-Amplifikate der Hausschweine lagen zwischen 81 und 82 °C. Bei 4 mmol/l Magnesiumchlorid lag die Schmelztemperatur am höchsten, bei 3 mmol/l am niedrigsten. Zwei verschiedene Aufarbeitungen der gleichen Probe mit gleicher Magnesiumchloridkonzentration (HS5) zeigen den gleichen Schmelzpunkt.

Die Schmelzkurven der Cytb 1f/2r-Amplifikate verschiedener Proben (Abbildung 65) mit einer Magnesiumchloridkonzentration von 4 mmol/l zeigt drei Gruppen mit den Schmelzpunkten 82,1 °C, 82,4 °C und 82,7 °C. In jeder der Gruppen sind Amplifikate von Hausschwein-DNA vertreten. Die Amplifikate der Wildschwein-DNA (hier nur Probe 22 dargestellt) verteilen sich ebenfalls über diesen Schmelzbereich zwischen 82 und 83 °C.

8.2 Schmelzpunktbestimmung mit Sybr® Green I bei D-Loop-Amplifikaten

Für die PCR wurde der gleiche Reaktionsansatz wie unter 8.1 beschrieben verwendet. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 55 dargestellt.

Tabelle 55: Temperaturprogramm für die PCR im D-Loop-Bereich mit dem LightCycler™.
Im Anschluss an die für den LightCycler™ optimierte PCR folgt die Aufnahme einer Schmelzkurve durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung beim langsamen Aufheizen der Temperatur von 40 °C auf 94 °C.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Heizrate (°C/s)	Zyklen	Messmodus
Aktivierung und Denaturierung	4:00	95	20	40	single
Denaturierung	0:10	95	20		
Anlagerung	0:15	DL 1f/3r = 55 °C DL 2f/5r = 65 °C DL 4f/6r = 60 °C	20		
Fortführung	0:05	72	20		
Vervollständigung	1:00	72	20		
Schmelzkurve Start	0:01	40	0,1		continuos
Schmelzkurve Ende	0:01	94	20		-
Kühlung	0:30	40	20		-

Im Anschluss an die mit dem Sybr® Green I PCR-Kit am LightCycler™ durchgeführte PCR wurde eine Schmelzkurve von 40 bis 94 °C aufgenommen. Anschließend wurden die Schmelzpunkte der Proben bestimmt, die in Abbildung 66 eingezeichnet sind.

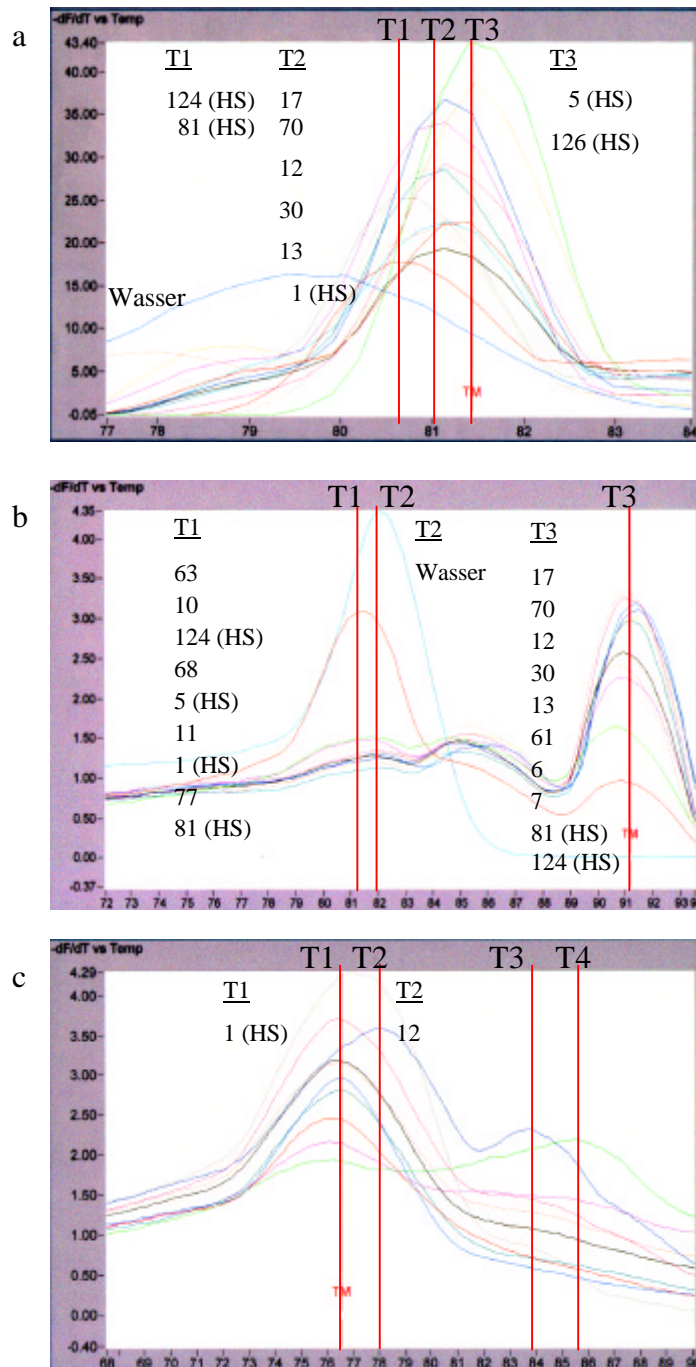


Abbildung 66: Schmelzkurven der D-Loop-Amplifikate von Haus- und Wildschweinproben mit den Primerpaaren a) DL1f/3r b) DL2f/5r c) DL4f/6r.

Markiert sind die Schmelzpunkte der Proben. Bei (b) und (c) sind bei einigen Kurven zwei Maxima vorhanden. Die Schmelztemperaturunterschiede zwischen den Proben liegen unter 2 °C.

Die Schmelzkurven der D-Loop-Amplifikate (Abbildung 66) zeigen nur leichte Variationen der Schmelzpunkte zwischen verschiedenen Proben. Die Schmelzpunkte der DL 1f/3r-Amplifikate liegen alle in dem Bereich von 80,7 - 81,5 °C. Die darin enthaltene Aufspaltung in drei Gruppierungen (80,7, 81,2 und 81,5 °C) zeigen keinerlei Korrelation zur

Probenidentität. Die Schmelzkurven der DL 2f/5r-Amplifikate zeigen bei ca. 82 °C ein unspezifisches Produkt (u.a. bei Wasser), während der Schmelzpunkt der Proben mit 91 °C sehr hoch liegt. Bei DL 4f/6r-Amplifikaten liegt der Schmelzpunkt mit einer Ausnahme bei 76,6 °C.

8.3 Primer für kleinere Amplifikate und Sonden

Zur Verwendung der Differenzierungsmethode in Real-Time-PCR-Geräten und zur Optimierung der PCR auch bei stärker degradierter DNA wurden neue Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden entwickelt. Die Primer liegen in dem Bereich des 665 Bp-Amplifikats, in dem Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen vorhanden sind. Um bei der Sondensequenz und der RFLP-Analytik flexibel zu sein, wurden je zwei forward- und reverse-Primer entwickelt, die vier unterschiedliche Amplifikate erzeugen (Abbildung 67). Die Lage der Amplifikate im D-Loop und die Größe von Primern und Amplifikaten sind in der Tabelle 10 angegeben.

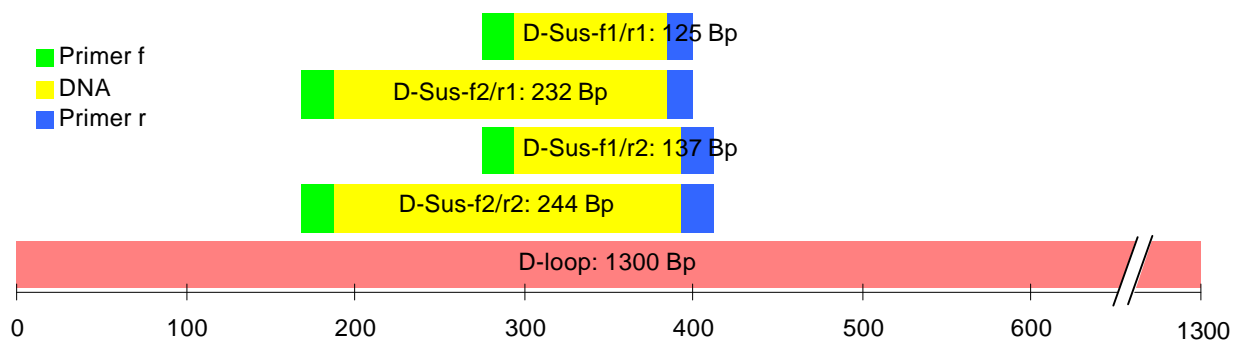


Abbildung 67: Lage der Primer für die verkürzten Amplifikate im D-Loop.

Die Primer liegen in dem Bereich des 665 Bp großen DL1f/3r-Amplifikats, in dem Sequenzunterschiede zwischen Haus- und Wildschwein festgestellt wurden. Jeweils zwei forward und reverse-Primer führen zu vier möglichen PCR-Produkten der Größe 125-244 Bp.

Das System I mit Primer D-Sus-f1 kann auch nach der Real-Time-PCR zur Bestätigung in einer RFLP-Analytik eingesetzt werden. Die Sequenz hat für beide Enzyme nur eine Schnittstelle, so dass entweder kein Schnitt erfolgt oder bei *Bfa*I Fragmente der Größe 8 und 73 Bp sowie bei *Tsp*509I Fragmente der Größe 16 und 85 Bp. Das System II mit Primer D-Sus-f2 hat mehrere Schnittstellen, die wiederum zu Kontrollzwecken für eine vollständige Restriktion verwendet werden können.

Die Primer führen zu kurzen Amplifikaten im D-Loop-Bereich. Je nach Kombination der zwei forward- und reverse-Primer entstehen die erwarteten Amplifikate der Größe 125, 137, 232 und 244 Bp (Abbildung 68).

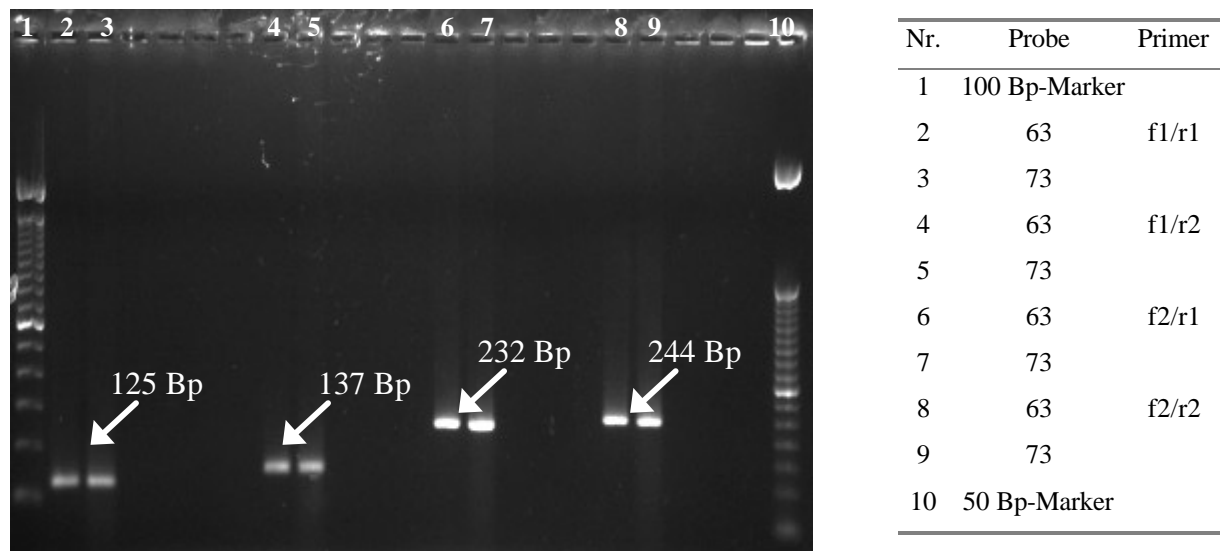


Abbildung 68: Amplifikation ausgewählter Proben mit den kurzen D-Loop-Primern.
Alle Primer-Kombinationen führen zu Amplifikaten der erwarteten Größe.

Die optimalen Bedingungen der PCR wurden durch Temperatur- und Salzkonzentrationsgradienten festgestellt. Die optimalen Bedingungen liegen bei allen Primersystemen bei einer Anlagerungstemperatur von 51 °C und einer Magnesiumchloridkonzentration von 2 mmol/l. Das Primerpaar D-Sus f1/r2 zeigte bei einer Annelaingtemperatur von 60 °C und 2 mmol/l Magnesiumchlorid im Agarosegel bei guten Amplifikaten für Haus- und Wildschweine keine Amplifikate für Rind, Huhn, Pute, Schaf, Ziege und Pferd.

8.3.1 RFLP

Es wurden RFLPs mit den Enzymen *BfaI* und *Tsp509I* mit den unterschiedlich großen D-Loop-Amplifikaten der vier Primer-Kombinationen durchgeführt. Alle Restriktionsmuster entsprachen den theoretisch erwarteten Bandengrößen, die Fragmente der Primer D-Sus f1/r2 waren von der Amplifikat sowie der Restriktionsgröße her am günstigsten und wurden weiter untersucht. Die Darstellung der Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Tsp509I* und *BfaI* an den 137 Bp großen Amplifikaten mit den Primern D-Sus f1 und D-Sus r2 sind mit den entstehenden Fragmentgrößen in Abbildung 69 dargestellt.

Variante CC: Schnitt *Bfa*I; Fragmente: 32+105 Bp

*Bfa*I

5'-ataactccagtcaaacatgcatataccaccactagatcacgagcttaactaccatgccgcgtgaaaccagcaacccgcttggcagg
gatccctcttctcgctccgggcccataaacctggggggtttctattgatga-3'

Variante TT: Schnitt *Tsp*509I; Fragmente: 46 + 91 Bp

*Tsp*509I

5'-ataactccagtcaaacatgcatataccaccattagatcacgagcttaattaccatgccgcgtgaaaccagcaacccgcttggcagg
gatccctcttctcgctccgggcccataaacctggggggtttctattgatga-3'

Variante CT: Schnitt *Bfa*I; Fragmente: 32 + 105 Bp

und *Tsp*509I; Fragmente: 46 + 91 Bp

*Bfa*I *Tsp*509I

5'-ataactccagtcaaacatgcatataccaccactagatcacgagcttaattaccatgccgcgtgaaaccagcaacccgcttggcagg
gatccctcttctcgctccgggcccataaacctggggggtttctattgatga-3'

Variante TC: kein Schnitt; Fragment: 137 Bp

5'-ataactccagtcaaacatgcatataccaccattagatcacgagcttaactaccatgccgcgtgaaaccagcaacccgcttggcagg
gatccctcttctcgctccgggcccataaacctggggggtttctattgatga-3'

Legende:

Primer

Mutationen

Enzym-Erkennungssequenz

Abbildung 69: Schnittstellen der Restriktionsenzyme in den Amplifikaten der Primer D-sus f1 und D-Sus r2.

Dargestellt sind die Erkennungssequenzen und die Schnittstellen der Enzyme sowie die Position der Primer und der Polymorphismen in dem 137 Bp großen Amplifikat.

Die RFLP-Analytik der PCR-Amplifikate mit den Primern D-Sus f1 und D-Sus r2 sind in Abbildung 70 und Abbildung 71 zu sehen. Aus dem 137 Bp großen Amplifikat entstehen mit *BfaI* in der Regel bei Wildschweinen Fragmente der Größe 105 und 32 Bp, während Hausschweine überwiegend nicht geschnitten werden. Bei der RFLP mit *Tsp509 I* entstehen Fragmente der Größe 91+46 Bp.

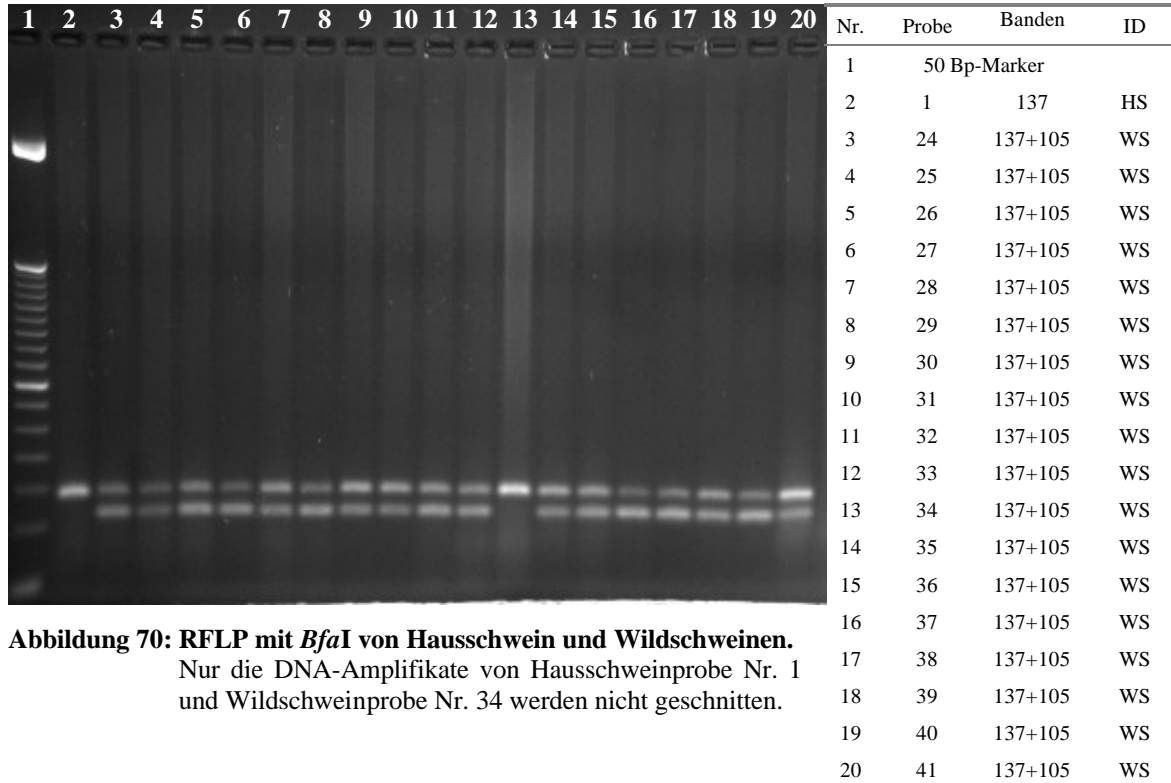


Abbildung 70: RFLP mit *BfaI* von Hausschwein und Wildschweinen.
Nur die DNA-Amplifikate von Hausschweinprobe Nr. 1 und Wildschweinprobe Nr. 34 werden nicht geschnitten.

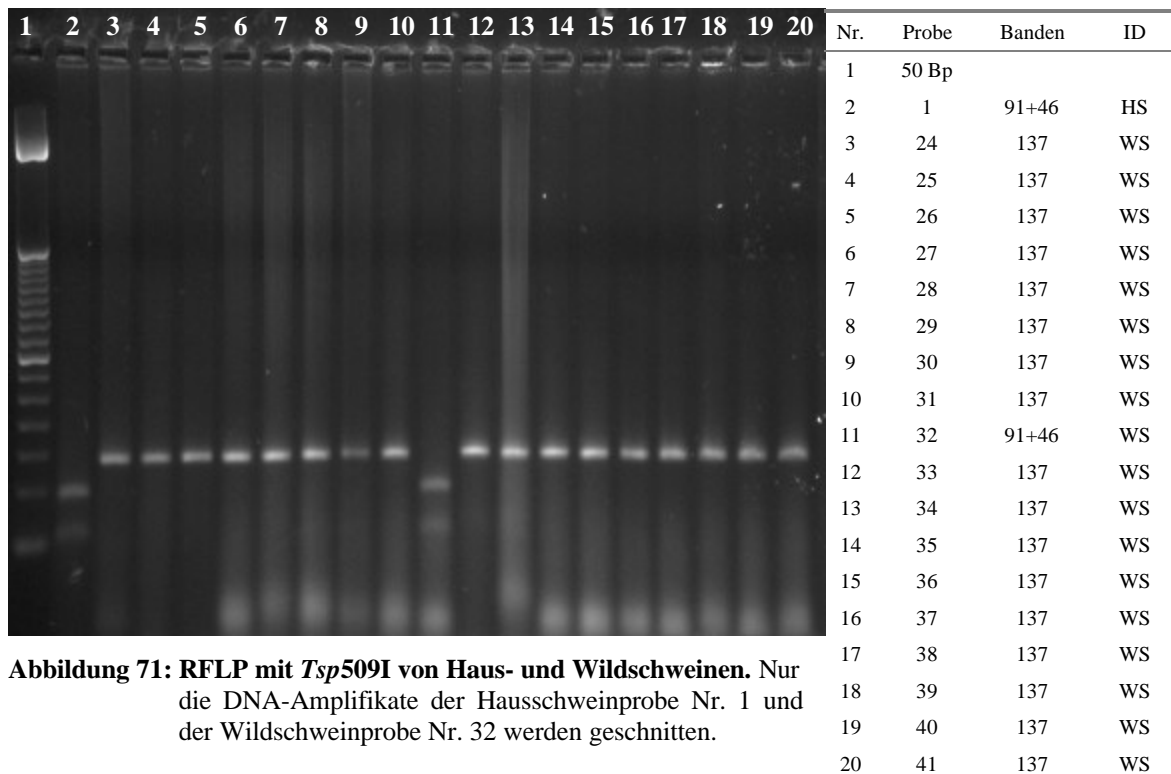


Abbildung 71: RFLP mit *Tsp509I* von Haus- und Wildschweinen. Nur die DNA-Amplifikate der Hausschweinprobe Nr. 1 und der Wildschweinprobe Nr. 32 werden geschnitten.

Tabelle 56: In der RFLP mit den Enzymen *Bfa*I und *Tsp*509I entstandene Fragmente aus dem 137 Bp großen Amplifikat der PCR mit den Primern D-Sus f1/r2.
Nr. = Probennummer entsprechend Tabelle 12; Form: HS = Hausschwein, WS = Wildschwein

Probe Nr.	Form	<i>Bfa</i> I	<i>Tsp</i> 509I
1	HS	137	91+46
5	HS	137	91+46
6	WS	105+32	137
7	WS	105+32	137
8	WS	105+32	137
9	WS	105+32	137
10	WS	105+32	137
11	WS	105+32	137
12	WS	105+32	137
13	WS	105+32	137
14	WS	105+32	137
15	WS	105+32	137
16	WS	105+32	137
17	WS	105+32	137
18	WS	105+32	137
19	WS	105+32	137
20	WS	105+32	137
21	WS	105+32	137
22	WS	105+32	137
23	WS	105+32	137
24	WS	105+32	137
25	WS	105+32	137
26	WS	105+32	137
27	WS	105+32	137
28	WS	105+32	137
29	WS	105+32	137
30	WS	105+32	137
31	WS	105+32	137
32	WS	105+32	91+46
33	WS	105+32	137
34	WS	137	137
35	WS	105+32	137
36	WS	105+32	137
37	WS	105+32	137
38	WS	105+32	137
39	WS	105+32	137
40	WS	105+32	137
41	WS	105+32	137

Tabelle 57: Zusammenhang zwischen Restriktionsverhalten und Genotyp.

Dargestellt sind exemplarisch vier Proben mit unterschiedlichem Schnittverhalten beim Verdau mit *Bfa*I und *Tsp*509I. Aufgeführt sind auch die Nukleotide an Position 212 und 229 des D-Loops.

Probe Nr.	<i>Bfa</i> I-Schnitt	<i>Tsp</i> 509I-Schnitt	Genotyp Position 212/229
Hausschwein 1	-	+	T/T
Wildschwein 6	+	-	C/C
Wildschwein 31	+	+	C/T
Wildschwein 34	-	-	T/C

8.3.2 HYBRIDISIERUNGSSONDEN

Das Sonden-Primer-System wurde zunächst mit der Software Primer Express von Perkin Elmer für das Prinzip der TaqMan™-Technologie (Holland *et al.*, 1991) berechnet (Abbildung 72).

ATTGATCGTA CATAGCACAT ATCATGTCAA	ATAACTCCAG TCAACATGCA	300	Primer D-Sus-f1
TAACTAGCAT GTATCGTGTA TAGTACAGTT	TATTGAGGTC AGTTGTACGT		
TATCACCAcc attagatcac gagcttaatt acc	ATGCCCG CGTGAAACCA	350	TaqMan™-Sonde
ATAGTGGTgg taatctagtg ctggaattaa tgg	TACGGGC GCACTTTGGT		
GCAACCCGCT TGGCAGGGAT CCTCTTCTN	AGCTCCGGGN CCATAAACCG	400	Primer D-Sus-r1
CGTTGGGCGA ACCGTCCTTA GGGAGAAGAN	TCGAGGCCCN GGTATTGGC		
TGGGGGTTTC TATTGATGAA CTTTACAGGC	ATNTGGANCT TACTTCAGGA	450	
ACCCCAAG ATAATACTT GAAATGTCCG	TANACCTNGA ATGAAGTCCT		

Abbildung 72: Primer und Sonde für die Real-Time-PCR.

Berechnet wurden die Primer passend zu einer TaqMan™-Sonde. In den Versuchen wurde aber eine HybProbe™-Sonde verwendet.

Die Anforderungen an die Sonde war, dass die Anlagerung im Amplikon in dem Bereich der Basenunterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen erfolgt. Bei beiden Mutationen handelt es sich um einen C-T-Substitution. Um eine Aussage über die Identität der untersuchten Probe machen zu können, müssen beide Mutationen gleichzeitig detektiert werden.

Diese Vorgaben lassen Variationen in der Größe der Sonde links und rechts von den mutierten Nukleotiden zu. Damit kann eine optimale Schmelztemperatur der Sonde und ein optimiertes Bindungsverhalten der Sonde eingestellt werden. Bei feststehendem Anlagerungsbereich der Sonde an die Ziel-DNA (Abbildung 73) existieren auf beiden mitochondrialen DNA-Strängen insgesamt acht verschiedene Möglichkeiten für die Sondensequenz. In Näherung wird die optimale Kombination berechnet. Auch die Wahrscheinlichkeit von entstehenden Sekundärstrukturen, die möglichst gering sein sollte, kann so optimiert werden.

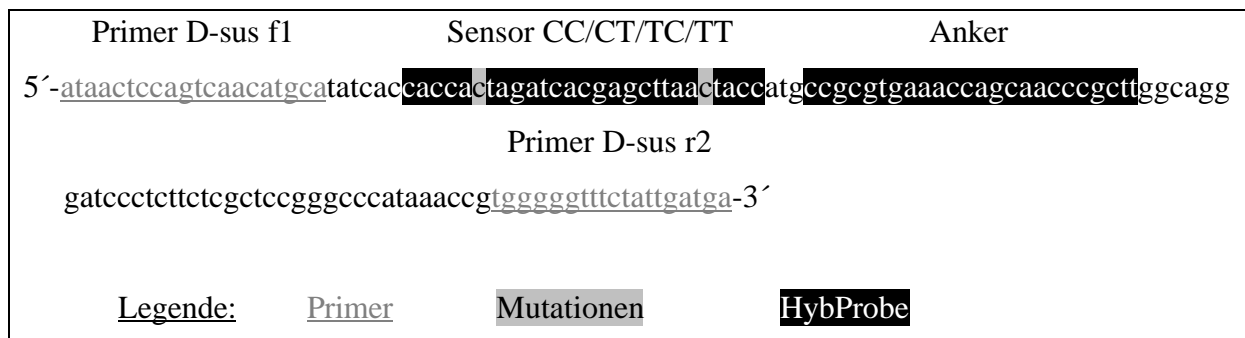


Abbildung 73: Lage der Sonde und der Mutationen im L-Strang des Amplifikationsbereichs.

Die auf der FRET-Technologie basierende Sonde, besteht aus einem Sensor, der auf den zwei Punktmutationen liegt und dem in unmittelbarer Nähe liegenden Anker.

Der H-Strang (Heavy-Strand) ist für die Sondenanlagerung besser geeignet als der L-Strang (Light-Strand). Da die polymorphen Basen sehr nahe am forward-Primer liegen, kann man die verschiedenen Kombinationen nicht mittels 5'-markierter Sensor-Sonden erfassen und daher nicht mit verschiedenen Farbstoffen parallel bestimmen. Hier wäre ggf. die Verwendung des forward-Primers D-Sus f2 notwendig.

Die Differenzierung eines C→T Austausches mit einer C-Sonde ist für die mögliche C-A Fehlpaarung gut, da in der Regel durch diese Fehlpaarung eine Reduzierung der Annealingtemperatur um 5 bis 9 °C auftritt. Bei Verwendung einer T-Sonde tritt im Fall der T-G Fehlpaarung nur eine erwartete Reduzierung um 2 bis 3 °C gegenüber der C-G-Paarung auf. Das bedeutet, dass die entsprechenden Sonden mit C gut auf die entsprechende Mutation ansprechen, solche mit T aber nicht.

Für eine CC-spezifische Sonde (1. und 2. Mutation, siehe Tabelle 58) werden fast ununterscheidbare Schmelzpunkte für CT und TC berechnet. Es wird daher eine allgemeine Ankersonde verwendet und die Schmelzpunkte über verschiedene Sensor-Sonden (siehe Tabelle 58) experimentell bestimmt. Vermutlich lassen sich dann in einem Ansatz alle Varianten erkennen, wenn man die CC-spezifische Sonde und eine deutlich höherschmelzende CT- oder TC-spezifische Sonde parallel verwendet. Für die Sonden der Tabelle 58 werden die in Tabelle 59 genannten Schmelztemperaturunterschiede erwartet.

Tabelle 58: Oligonukleotide für die Real-Time-PCR.

In der Tabelle aufgeführt sind die für die Real-Time-PCR mit dem LightCycler™ hergestellten Primer und Sonden (*berechnet und hergestellt von TIB MOLBIOL), die sich an den mitochondrialen H- bzw. L-Strang anlagern. Detektiert werden die Polymorphismen an Position 219 und 229 des D-Loops.

Bezeichnung	Sequenz und Polymorphismen (Position 212/229)	Strang	Ziel	T _m (°C)
D-sus f1	ATAACTCCAgTCAACATgCA	H	181-200	50,0
D-sus r2	TCATCAATAgAAACCCCCA	L	317-299	51,2
CC*	CACCACTAgATCACgAgCTTAAC T ACC X	H	207-233	59,4
CT*	CACCACTAgATCACgAgCTTAAT T ACC X	H	207-233	59,0
TC*	CACCAT T AgATCACgAgCTTAAC T ACC X	H	207-233	59,0
TC-lang*	ATCACCACCAT T AgATCACgAgCTTAAC T ACCAT X	H	202-235	66,1
TT*	CACCAT T AgATCACgAgCTTAAT T ACC X	H	207-233	58,5
TT-lang*	ATCACCACCAT T AgATCACgAgCTTAAT T ACCAT X	H	202-235	65,7
Anker*	CCgCgTgAAACCAgCAACCCgCTT p	H	237-260	74,3

Tabelle 59: Erwartete Temperaturdifferenzen zwischen den Schmelzpunkten der Sonden.

Die größten Unterschiede zwischen den Schmelzpunkten bestehen bei komplementärer Sequenz von Sonde und Ziel-DNA (fett dargestellt).

	CC-Sonde	CT-Sonde	TC-Sonde	TT-Sonde
CC	0 °C	- 2 °C	- 2 °C	- 6 °C
CT	-7 °C	0 °C	- 8 °C	- 2 °C
TC	-7 °C	- 8 °C	0 °C	- 2 °C
TT	-10 °C	- 7 °C	- 7 °C	0 °C

8.3.3 REAL-TIME-PCR MIT DEM PRIMERPAAR D-SUS F1/R2 UNTER VERWENDUNG VON HYBRIDISIERUNGSSONDEN

Tabelle 60: Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR im LightCycler™ mit Hybridisierungs sonden. Berechnet für einen 20 µl Reaktionsansatz. Gegenüber der herkömmlichen PCR wurde hier ein Ready-to-use Reaktionsgemisch und eine höhere Magnesiumchloridkonzentration verwendet.

Substanz (Einheit)	Ausgangskonz.	Endkonz.	Menge pro Ansatz (µl)
Wasser			10,3
Ready-to-use Reaktionsgemisch	10-fach	1-fach	2
Magnesiumchlorid (mmol/l)	25	4	3,2
Primer 1 (µmol/l)	20	0,5	0,5
Primer 2 (µmol/l)	20	0,5	0,5
Sonde (µmol/l)	4	0,3	1,5
DNA-Extrakt (pmol/l)			2
Gesamtvolumen			20

Tabelle 61: Temperaturprogramm für die PCR mit den Primern D-sus f1/r2 im LightCycler™ Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte pro Zyklus einmal in der Anlagerungsphase. Im Anschluss an die PCR wurde ein Schmelztemperatur-Programm gefahren, bei dem eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz erfolgte.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Heizrate (°C/s)	Zyklen	Messmodus
Aktivierung und Aufschmelzen	4:00	95	20	40	-
Denaturierung	0:10	95	20		-
Anlagerung	0:15	60	20		single
Fortführung	0:05	72	20		-
Vervollständigung	1:00	72	20		-
Schmelzkurve Start	0:01	40	0,1		continuos
Schmelzkurve Ende	0:01	94	20		-
Kühlung	0:30	40	20		-

Die erste Ableitung der Schmelzkurve zeigt am Maximum den Schmelzpunkt an. In Abbildung 74 bis Abbildung 78 sind die Kurven der fünf verschiedenen Sonden für sechs untersuchte Proben dargestellt.

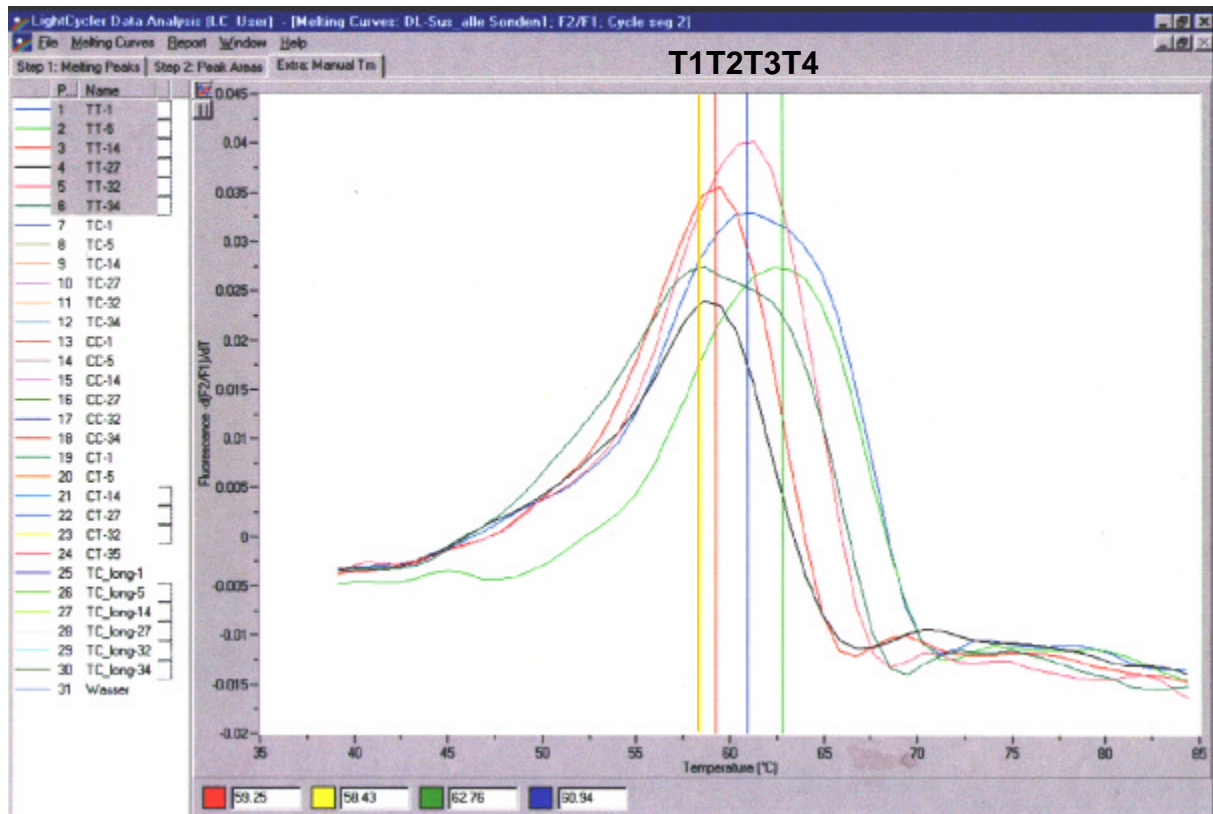


Abbildung 74: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der TT-Sonde.

Es sind vier Maxima über einen Temperaturbereich von 3,5 °C vorhanden. Die Schmelzpunkte der Amplifikate der Hausschweine 1 und 5 liegen bei T3 und T4, die von Wildschwein 32 bei T3 und die der restlichen Wildschweine 14, 27 und 34 bei T1 und T2.

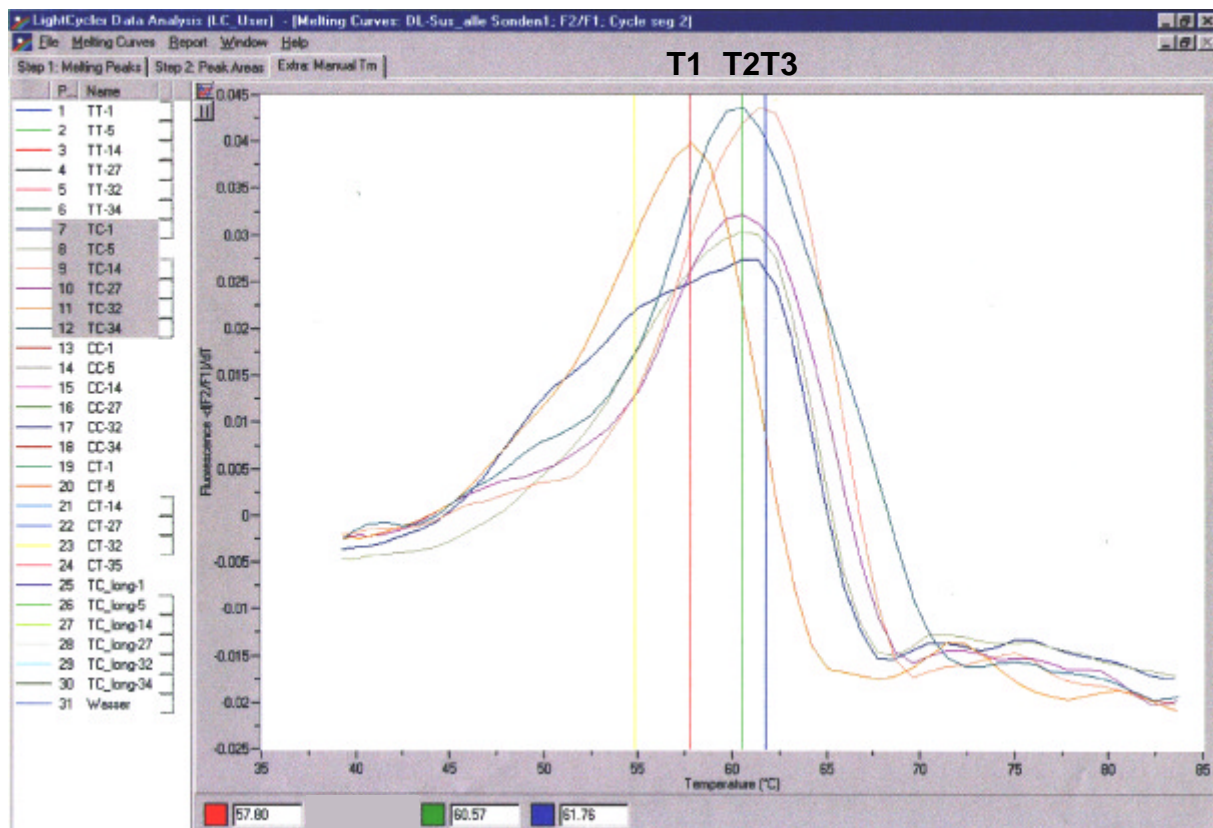


Abbildung 75: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der TC-Sonde

Es sind drei Maxima über einen Temperaturbereich von 4 °C vorhanden. Die Schmelzpunkte der Amplifikate der Proben 1, 5, 27 und 34 liegen bei T2, die von Wildschwein 14 bei T3 und von Wildschwein 32 bei T1.

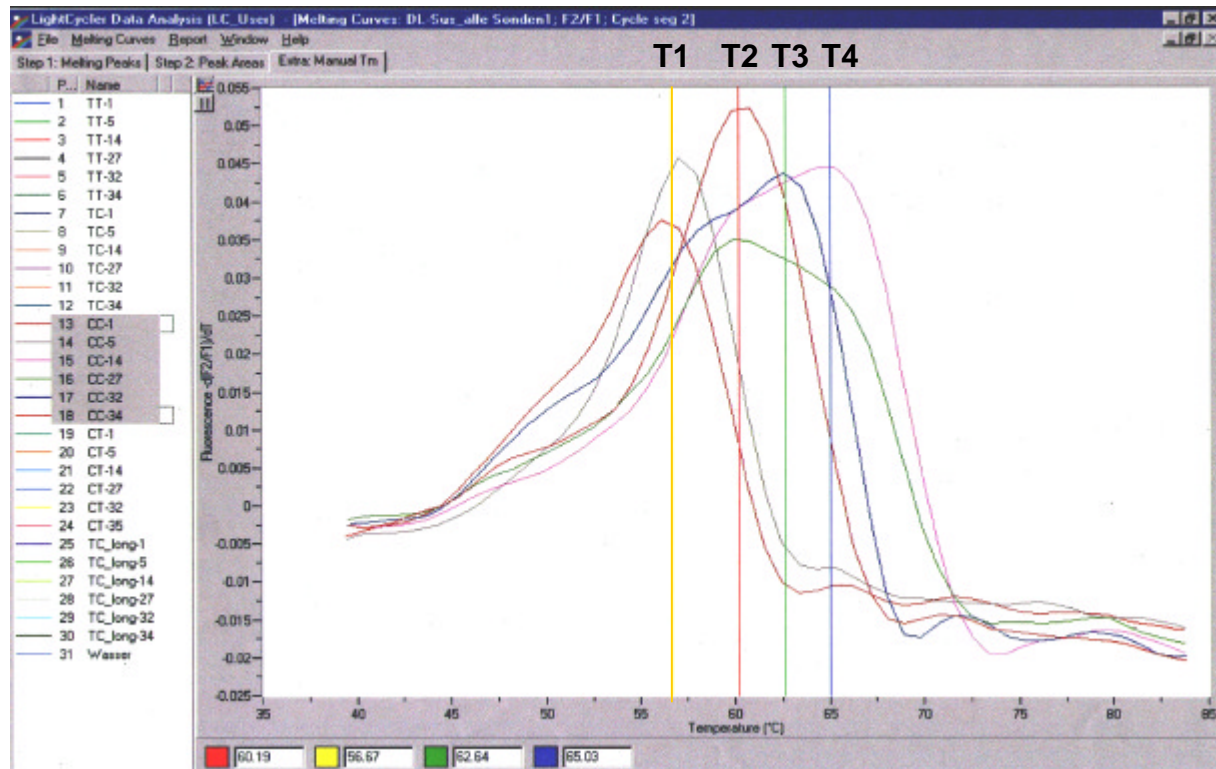


Abbildung 76: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der CC-Sonde.

Es sind vier Maxima über einen Temperaturbereich von 8,5 °C vorhanden. Die Schmelzpunkte der Amplifikate der Hausschweine 1 und 5 liegen bei T1, die der Wildschweine 14, 27, 32 und 34 verteilen sich über T2-T4.

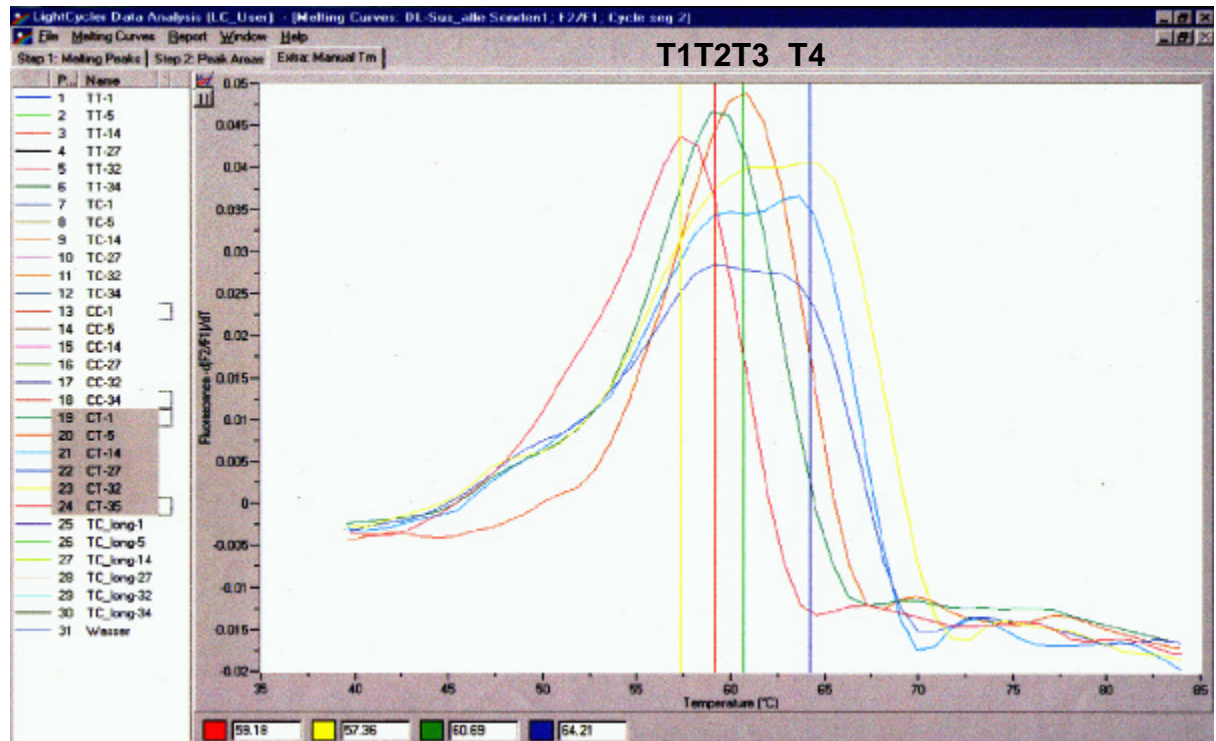


Abbildung 77: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der CT-Sonde.

Es sind vier Maxima über einen Temperaturbereich von 7 °C vorhanden. Die Schmelzpunkte der Amplifikate der Hausschweine 1 und 5 liegen bei T2 und T3, von Wildschwein 34 bei T1. Die übrigen Wildschweine weisen zwei Maxima jeweils bei T2 und T4 auf.

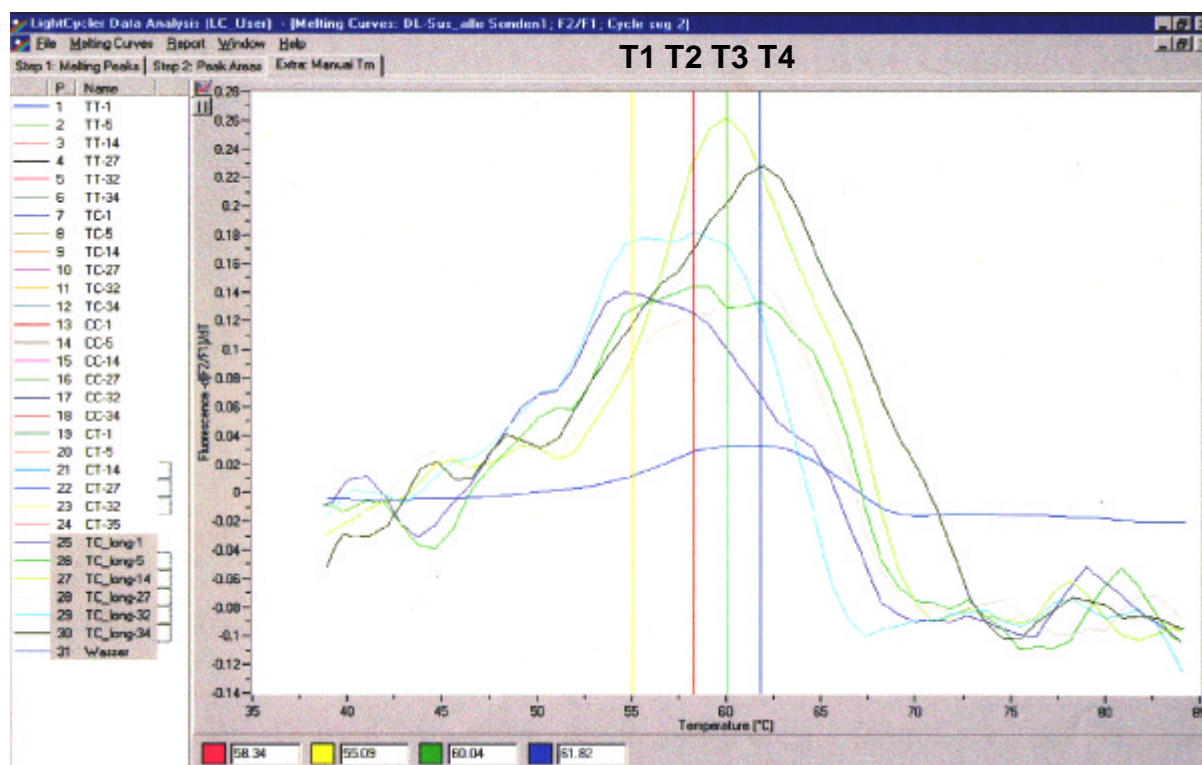


Abbildung 78: Erste Ableitung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven mit der TC-long-Sonde.

Es sind vier Maxima über einen Temperaturbereich von 6 °C vorhanden. Bei den Wildschweinproben 14 und 34 liegt der Schmelzpunkt der Amplifikate bei T3 und T4, bei den übrigen Proben liegt der Schmelzbereich zwischen T1 und T4.

Die aus diesen Kurven ablesbaren Schmelzpunkte sind in Tabelle 62 zusammengestellt. Markiert wurden die nach unten (grau unterlegt) und nach oben (fett) innerhalb der Messung mit einer Sonde deutlich abgrenzbaren Schmelztemperaturen.

Tabelle 62: Schmelztemperaturen der Sonden bei verschiedenen Proben.

Fett markiert sind die Maximalwerte, grau hinterlegt sind die Minimalwerte.

Probe	Form	Genotyp	Sonde				
			TT	TC	CC	CT	TC-long
1	HS	TT	60,9	60,6	56,6	59,2	55,0
5	HS	TT	62,8	60,6	56,8	60,7	58,3
14	WS	CC	59,3	61,8	65,0	59,2+64,0	60,0
27	WS	CC	58,6	60,6	60,2	59,2	61,0
32	WS	CT	60,9	57,8	62,6	64,2	58,0
34	WS	TC	58,4	60,6	60,2	57,4	61,8

Die Übereinstimmung des Genotyps mit der Sondensequenz führt nur bei der CT-Sonde zu einer deutlich erhöhten Schmelztemperatur als bei einer Fehlpaarung. Die komplementäre Sequenz zwischen Sonde und Amplifikat führt zu einer stärkeren Erniedrigung der Schmelztemperatur gegenüber Kombinationen mit einer oder keiner Fehlbindung. Die

Schmelzkurven mit der TC-long-Sonde weisen mehrere Wendepunkte und daher keinen deutlichen Schmelzpunkt auf. Die ausgewählten Schmelztemperaturen bei dieser Sonde zeigen keine Korrelation zum Genotyp der untersuchten Schweine. In Tabelle 63 sind die Abweichungen der Extremwerte von den am nächsten gelegenen weiteren Werten angegeben. Weiterhin ist die Spannweite aller Werte und die Spannweite ohne die Extremwerte angegeben.

Tabelle 63: Abweichungen der Extremwerte vom nächsten Wert.

Fett markiert sind die Differenzen der Maximalwerte vom nächsten Wert, grau hinterlegt sind die Differenzen der Minimalwerte zu dem nächst größeren Wert. Aus der Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert ergibt sich die Gesamtspannweite. Ohne Berücksichtigung der in dieser Tabelle aufgeführten Extremwerte erhält man die Spannweite ohne Extreme. Deren Anteil an der Spannweite aller Werte ist in Prozent angegeben.

Probe	Form	Genotyp	Sonde				
			TT	TC	CC	CT	TC-long
1	HS	TT			-3,6		-3
5	HS	TT	+1,9				
14	WS	CC		+1,2	+2,4		
27	WS	CC					
32	WS	CT		-2,8		+3,5	
34	WS	TC	-0,9			-1,8	+0,8
Gesamtspannweite			4,4	4	8,4	6,8	6,8
Spannweite ohne Extrema			1,6	0	2,4	1,5	3
% Spannweite ohne Extrema von Gesamtspannweite			36	0	29	22	44

Die CC-Sonde ergibt den größten Unterschied in der Schmelztemperatur zwischen der Ziel-DNA mit zwei nicht komplementären Basen und den restlichen Varianten. Die Amplifikate der Hausschweine mit identischer Sequenz in diesem Bereich liegen mit ihrem Schmelzpunkt um 3,4 bzw. 3,6 °C unter dem nächst niedrigsten der Amplifikate der Wildschwein-DNA.

9 RAPD-PCR

Die vier Random-Primer mit leichten Sequenzunterschieden vor allem am 3'-Ende wurden hinsichtlich der optimalen Annealingtemperatur, der Zyklenzahl, der optimalen Magnesiumchloridkonzentration und der günstigsten Kombination der Primer getestet. Es wurde auch jeder Primer einzeln in doppelter Konzentration eingesetzt. Wie sich die Zyklenzahl und die Annealingtemperatur auf das entstehende RAPD-Muster auswirken, ist in Abbildung 79 zu sehen.

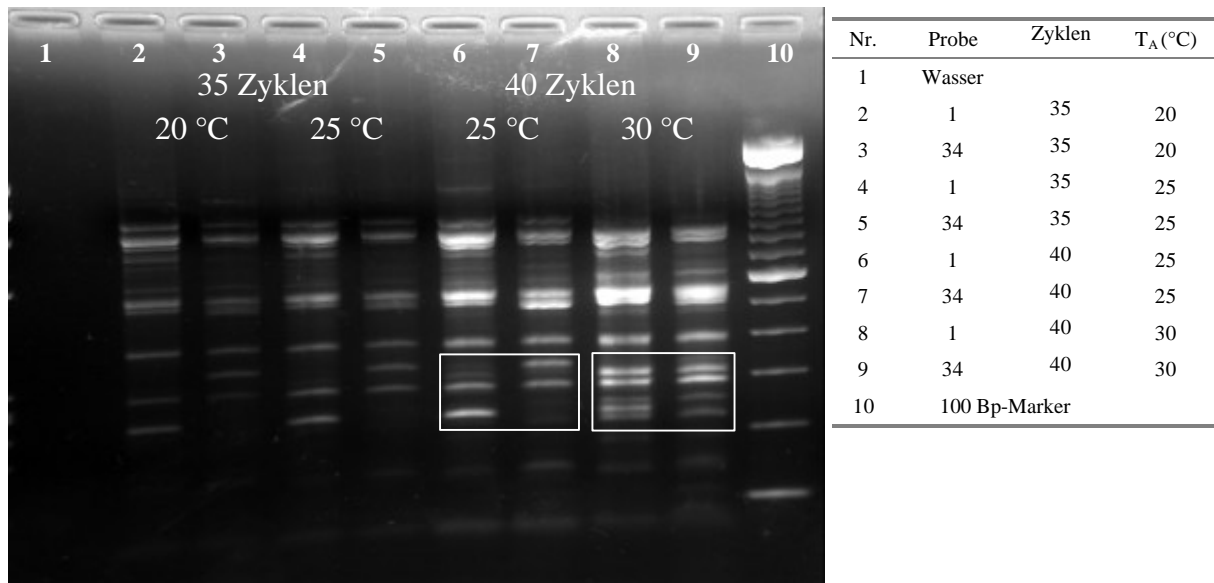


Abbildung 79: RAPD-PCR von Haus- und Wildschwein-DNA mit einer Primermischung aus Ra1, Ra2, Ra3 und Ra4.

Die Hausschweinprobe 1 und die Wildschweinprobe 34 sind jeweils unter gleichen Bedingungen amplifiziert worden. Variiert wurden die Annealingtemperatur (T_A) und die Zyklenzahl. Der Bereich, an dem die größten Unterschiede zu sehen sind, ist eingerahmt.

Bei der Mischung der vier RAPD-Primer entstehen zahlreiche Banden der Größe von etwa 50-1000 Bp. Bei 40 Zyklen sind die Banden wesentlich stärker als bei 35 Zyklen, ohne dass sich die Muster verändern. Die schwächeren Banden zwischen den Hauptamplifikaten sind deutlicher zu erkennen. Zwischen den RAPD-Muster der Annealingtemperaturen 20 °C und 25 °C sind kaum Unterschiede vorhanden, zwischen 25 und 30 °C Annealingtemperatur treten große Unterschiede auf. Die Temperaturerhöhung führt dazu, dass die Unterschiede der RAPD-Muster zwischen der Hausschwein- und der Wildschwein-Probe kleiner werden (markierter Bereich).

Die weiteren Versuche wurden mit dem Mastermix entsprechend Tabelle 64 und dem Temperatur-Zeit-Programm der Tabelle 65 durchgeführt.

Tabelle 64: Mastermix für die RAPD-PCR.

Die RAPD-PCR führte zu optimalen Ergebnissen bei Verwendung von 3 mmol/l Magnesiumchlorid und 1 µmol/l Primer. Auch die Konzentration der Polymerase wurde gegenüber den anderen PCR-Ansätzen leicht erhöht.

Substanz (Einheit)	Ausgangskonz.	Endkonz.	Menge pro Ansatz (µl)
Wasser			13,95
Puffer 10-fach (µmol/l)	10	1	2,50
Magnesiumchlorid (mmol/l)	25	3	3,00
dNTPs (mmol/l)	2,5	0,2	2,00
Primer 1 (µmol/l)	20	0,5	0,625
Primer 2 (µmol/l)	20	0,5	0,625
Polymerase: AmpliTaq Gold™ (U)	5	1,5	0,30
DNA-Extrakt (pmol/l)			2,00
Gesamtvolumen			25,00

Tabelle 65: Temperaturprogramm für die RAPD-PCR.

Die Anlagerungstemperatur ist mit 25 °C entsprechend der Kürze der Primer sehr niedrig. Die Zeit für die Primeranlagerung und die Fortführung wurde verlängert.

Prozess	Zeit (min:s)	Temperatur (°C)	Zyklen
Aktivierung und Denaturierung	8:00	95	40
Denaturierung	0:20	95	
Anlagerung	1:00	25	
Fortführung	1:20	72	
Vervollständigung	10:00	72	
Pause	∞	4	

Die Abbildung 80 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate von vier RAPD-PCR, die alle mit den oben genannten PCR-Bedingungen aber unterschiedlichen Primer-Kombinationen durchgeführt wurden. Mit jeweils zwei Primern wurde die DNA von Haus- und Wildschweinen amplifiziert.

ERGEBNISSE RAPD-PCR

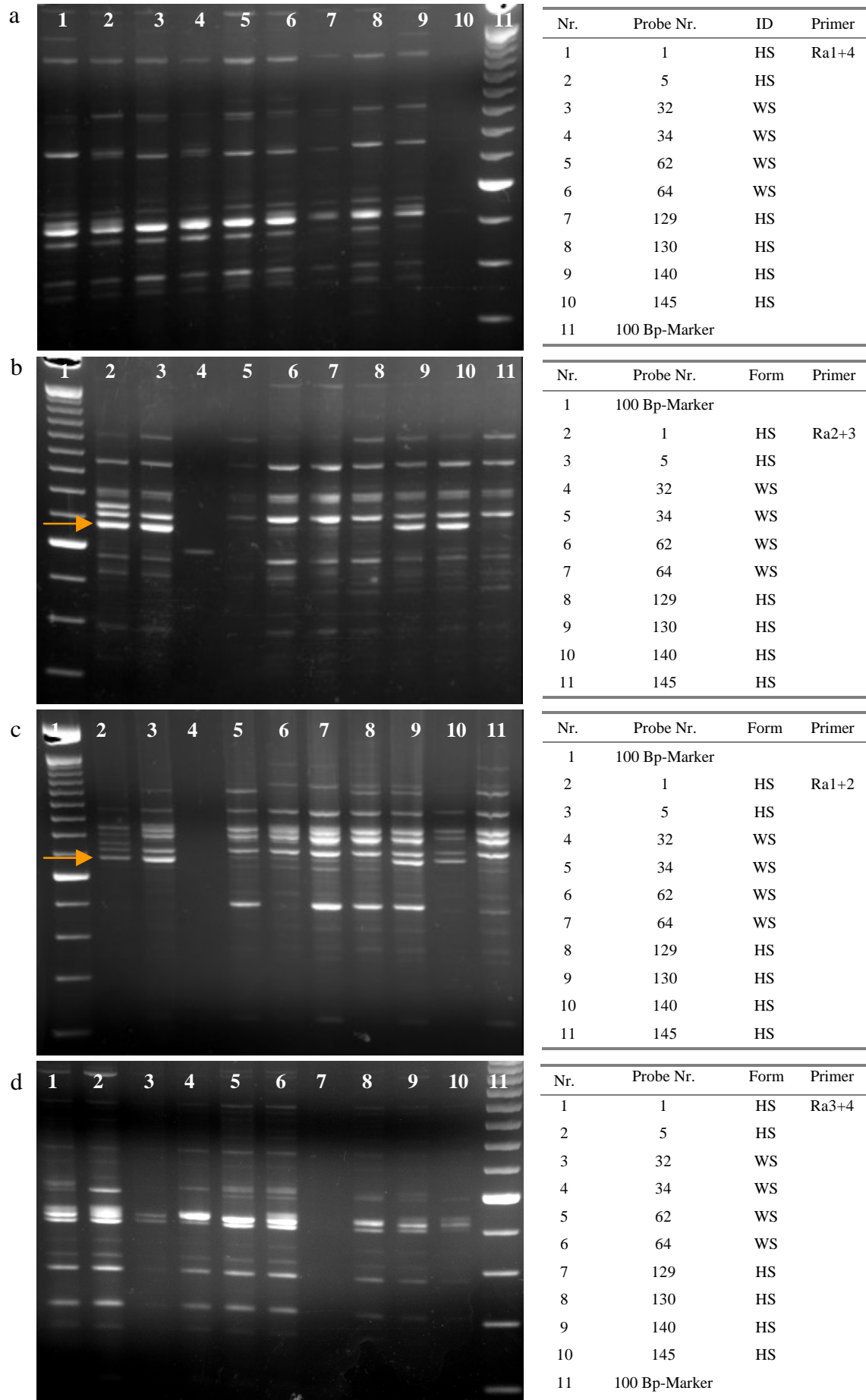


Abbildung 80: RAPD-PCR mit verschiedenen Primer-Kombinationen.

Bei Bild b und c sind die Positionen mit einem Pfeil markiert, an denen unterschiedliche Banden zwischen Haus (HS)- und Wildschwein (WS) bei bestimmten Bedingungen auftreten.

Durch die verschiedenen Primer-Kombinationen entstehen im Gel gut erkennbare Amplifikate der Größe von etwa 300 bis 1500 Bp. Bei den verschiedenen Kombinationen entstehen stark unterschiedliche Bandenmuster bei gleichen Proben. Bei Ra1+2 sowie 2+3 sind die Banden im Bereich von 500-1000 Bp konzentriert, während bei 1+4 und 3+4 die Banden gleichmäßiger über den Bereich von 300-1500 Bp verteilt sind. Zwischen den Proben sind nur leichte Unterschiede der Muster vorhanden. Bei Bild a und d treten zwischen den Haus- und Wildschweinen keine Unterschiede im Muster auf. Bei b und c sind größere Unterschiede vorhanden, die jedoch für eine Unterart nicht einheitlich sind. Die mit einem Pfeil markierte Bande mit der Größe von ca. 690 Bp entsteht bei vier von sechs Hausschweinen, während sie bei den untersuchten Wildschweinen nur schwach gebildet wird. Für die Bildung dieser Bande ist der Primer Ra2 verantwortlich, der in der PCR b und c verwendet worden ist.

VI DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen zu identifizieren, um diese zu einer Tierart gehörenden Formen analytisch differenzieren zu können. Zu diesem Zweck wurden verschiedene DNA-basierende Untersuchungsmethoden angewandt.

Dies umfasste die Prüfung und Optimierung von Nukleinsäure-Extraktionsmethoden, die Untersuchung bisher verfügbarer Methoden oder Zielsequenzen, die Identifizierung heterogener Bereiche zwischen Haus- und Wildschweinen sowie die Suche nach geeigneten Markersequenzen für die Differenzierung. Auf Basis geeigneter Marker sollten in der Routine anwendbare Nachweismethoden entwickelt werden, die für die Differenzierung in rohen und prozessierten Lebensmitteln verwendet werden können. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen werden im folgenden diskutiert.

1.1 Extraktion

1.1.1 EXTRAKTION AUS FLEISCH

Die Wahl der Aufarbeitungsmethode richtet sich nach der Zusammensetzung der Probe. Vier Aufarbeitungsmethoden wurden an Fleisch von vier Tierarten mit verschiedenen Prozessierungsgraden hinsichtlich der Eignung zur Extraktion von DNA aus Fleisch und Fleischerzeugnissen untersucht. Die Ergebnisse der DNA-Extraktion wurden anhand der Ausbeute an DNA und der nach einer PCR entstandenen Amplifikatbanden im Agarosegel bewertet.

Die CTAB-Aufarbeitungsmethode, die für die DNA-Extraktion aus pflanzlichem Material empfohlen wird (L-24.01-1 der Methodensammlung nach § 35 LMBG, BgVV 1997), wurde hier modifiziert durch Verwendung von Proteinase K in zwei verschiedenen Ansatzmaßstäben für die Extraktion von DNA aus Fleisch und Fleischerzeugnissen angewandt. Diese Methode ergab die besten Resultate hinsichtlich der extrahierten DNA-Mengen, des Arbeitsaufwandes und der Reinheit vor und nach einer zusätzlichen Aufreinigung über Säulen.

Die Guanidin-Methode erwies sich ebenfalls als gut geeignet, erfordert jedoch in jedem Fall eine zusätzliche Reinigung des DNA-Extraktes, auch wenn es unter idealen PCR-Bedingungen zu einer Amplifikation der DNA kommt.

Die zusätzliche Reinigung über Säulen führt bei allen Methoden zu verbesserten PCR-Ergebnissen bei nur geringem Verlust an extrahierter DNA. Die bei der Elektrophorese sichtbaren Banden der Amplifikate waren bei fast allen Proben nach der Säulenreinigung stärker und die Hintergrundfluoreszenz wurde deutlich reduziert. Die Verwendung von Säulen ist daher zu empfehlen. Zwischen den Ergebnissen der Säulenreinigung von Wizard®

und QIAGEN gab es nur geringe Unterschiede, die Anwendung der QIAGEN-Methode ist jedoch einfacher und schneller und ergab in der Regel eine höhere Ausbeute an DNA.

Die Verwendung von Proteinase K ist gegenüber der Aufarbeitung von pflanzlichen Proben bei Fleisch zur Extraktion der DNA aus der Matrix unentbehrlich, da ansonsten nur die DNA der äußeren Bereiche einer Fleischprobe extrahiert wird. Die hier getesteten Extraktionsmethoden wurden daher alle in Gegenwart von Proteinase K angewandt.

Bei Anwendung der CTAB-Methode im Mikro-Maßstab (ca. 100 mg Probe) wurden die Fleischstücke in Gegenwart von Proteinase K vollständig verdaut. Eine vorherige Zerkleinerung der Muskelfleisch-Proben durch Messer oder Ultra-Turrax führte zu keinen wesentlich verbesserten Resultaten, so dass auf diesen zeitaufwendigen und kontaminationsträchtigen Zerkleinerungsschritt verzichtet werden sollte. Zur Beschleunigung der Lyse kann der Ansatz nach Zugabe kleiner Plastikkügelchen unter starken Schüttelbewegungen in einem Thermomixer homogenisiert werden.

1.1.2 EXTRAKTION AUS BLUT

Die DNA-Extraktion aus Blut wurde mit der CTAB-Methode, dem GENERATION Capture Disk Kit der Firma Gentra Systems und dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma QIAGEN vorgenommen.

Die CTAB-Methode erwies sich für die Extraktion von DNA aus Blutproben weder im Mikromaßstab mit 200 µl Blut je Ansatz, noch im Makromaßstab mit 2 ml Blut als geeignet. Es konnte aus keinem Nukleinsäureextrakt einer Hausschwein-Blutprobe ein Amplifikat erzeugt werden.

Mit dem GENERATION Capture Disk Kit konnte bei nur einer von acht Aufarbeitungen ein PCR-Amplifikat erhalten werden. Ein entscheidender Nachteil dieses Kits ist außerdem, dass die DNA an ein Pellet adsorbiert und dieses Pellet in der PCR eingesetzt wird. Es besteht daher keine Möglichkeit, die DNA-Konzentration nach der Aufarbeitung zu prüfen und einzustellen, nur ein Aliquot der extrahierten DNA zu verwenden oder mehrere DNA-Ansätze aus einer Aufarbeitung zu fahren.

Bewährt hat sich der Aufarbeitungskit der Firma QIAGEN, bei dem mit der extrahierten DNA in der Regel gute Amplifikate durch die PCR erzeugt werden konnten. Hierfür wird nur eine geringe Menge an Probenmaterial benötigt (100-200 µl) und die extrahierte DNA liegt am Ende in einer wässrigen Suspension vor.

Es konnte nur mit einem Primer-System, das als Zielsequenz nukleäre DNA (Melanocortin-Rezeptor-Gen) hatte, ein Amplifikat erhalten werden, nicht aber mit einem Primer-System,

welches eine mitochondriale Zielsequenz (D-Loop) hatte. Dies kann an unterschiedlichen Effizienzen der PCR-Systeme gelegen haben. Ein wesentlicher Aspekt ist jedoch die geringere Menge an vorhandener mitochondrialer Ziel-DNA, da die Erythrozyten als wesentlicher zellulärer Bestandteil des Blutes keine Mitochondrien enthalten.

1.1.3 EXTRAKTION UNTER ANREICHERUNG MITOCHONDRIALER DNA

Eine Amplifikation von DNA-Bereichen aus Pseudogenen des mitochondrialen D-Loops, die z.B. bei Ratten identifiziert wurden (Zullo *et al.*, 1991) oder des *cytB*-Gens konnte bei den untersuchten Tierarten Schwein, Rind, Schaf, Huhn und Pute mit den verwendeten Primerpaaren nicht beobachtet werden. Die durchgeführten Restriktionen führten zu den erwarteten Fragmentlängen. Gelegentlich betrug die Summe der Fragmente das Doppelte der Amplifikatgröße, da nicht alle der zum Verdau eingesetzten Moleküle geschnitten wurden. Eine Reduzierung der DNA-Konzentration oder eine Erhöhung der Enzym-Konzentration führte zum vollständigen Verschwinden des ungeschnittenen Fragments, wenn dieses die Enzym-Erkennungssequenz beinhaltete. Weitere Untersuchungen hinsichtlich des Vorhandenseins von Pseudogenen (Collura *et al.*, 1996) bzw. die Anwendung der Methode nach Burgener und Hübner (1998) zur Anreicherung von mtDNA gegenüber nukleärer DNA wurde daher hier standardmäßig nicht notwendig.

1.2 Sequenzvergleiche

Während dieser Arbeit wurden kontinuierlich zahlreiche Recherchen in den Sequenz-Datenbanken vorgenommen. Vorhandene Sequenzen der Gattung *Sus* wurden überprüft, ob sie ein erkennbares Potential im Hinblick auf die Differenzierung von Haus- und Wildschweinen aufweisen. Im Falle des Vorhandenseins mehrerer Sequenzen von Tieren der Gattung *Sus* wurden diese Sequenzen aneinander ausgerichtet und miteinander verglichen. In einigen Fällen konnte nur auf die Sequenzen verschiedener Unterfamilien zurückgegriffen werden, um Aussagen hinsichtlich der Variabilität dieser Sequenz treffen zu können und ggf. Anlagerungsbereiche für Primer berechnen zu können.

Die Sequenzabweichungen wurden darauf hin untersucht, ob es sich um Mutationen eines Individuums handelt, oder ob es sich um SNPs handelt, der Basenaustausch also bei mehreren Individuen auftaucht. Es wurde untersucht, ob die SNPs charakteristisch für eine abzugrenzende Gruppe ist, so dass sich über sie Haus- von Wildschweinen, verschiedene Wildschweinpopulationen oder verschiedene Hausschweinrassen unterscheiden lassen.

Die Recherchen haben gezeigt, dass aus dem Vergleich von DNA-Sequenzen von Individuen verschiedener Arten, Gattungen und Familien keine Rückschlüsse hinsichtlich der Variabilität des DNA-Bereiches zwischen Individuen einer Art gezogen werden können.

1.2.1 D-LOOP

Der D-Loop zeigt in weiten Bereichen eine extrem große Sequenzheterologie zwischen Tieren der Ordnung Artiodactyla, wo nicht nur vermehrte Punktmutationen, sondern vor allem größere Bereiche mit Deletionen auftreten. Diese Deletionen im D-Loop sind die Hauptursache für die unterschiedlich großen mitochondrialen Genome bei verschiedenen Tierarten. Im Gegensatz dazu weisen die Sequenzen verschiedener Schweine untereinander nur Punktmutationen auf und diese auch nur in geringem Umfang.

Bei dem Vergleich der Unterschiede zwischen Individuen einer Rasse und den Unterschieden zwischen zwei Rassen bzw. zwischen Haus- und Wildschweinen konnte festgestellt werden, dass die Mutationen innerhalb einer Rasse ähnlich groß sind wie zwischen Individuen verschiedener Rassen. Es konnte keine Mutation gefunden werden, die sich in einer Unterart bei allen Individuen einheitlich von den Individuen der anderen Unterart unterschied. Unterschiede zwischen Haus- und Wildschweinen sind im D-Loop nur durch Betrachtung mehrerer Punktmutationen möglich.

1.2.2 CYTB-GEN

Die zu Beginn der Arbeit durchgeführten Sequenzvergleiche zwischen GenBank-Einträgen zeigten eine zu erwartende Abnahme der Mutationen bei Vergleichen zwischen Tieren verschiedener Familien über verschiedene Gattungen hin zu verschiedenen Arten einer Gattung. Der Sequenzvergleich zwischen der DNA verschiedener Arten lässt stark oder weniger stark konservierte DNA-Bereiche erkennen. Die wenigen zwischen Individuen einer Art gefundenen Sequenzunterschiede konzentrieren sich nicht auf die variableren Bereiche des Gens. Aus den Sequenzvergleichen zwischen Tierarten lassen sich somit nicht zwingend Rückschlüsse darauf ziehen, dass bestimmte variable Sequenzabschnitte auch ein hohes Potential für die Differenzierung nahe verwandter Taxa beinhalten.

1.3 Sequenzierungen

1.3.1 CYTOCHROM B-GEN

Die für das *cytB*-Gen entwickelten Primer führten bei allen amplifizierbaren DNA-Extrakten zu einem Amplifikat. Unspezifische Bindungen der Primer, die zu weiteren Banden führten, konnten durch Optimierung der PCR-Bedingungen verhindert werden.

Der Sequenzvergleich des *cytB*-Gens von verschiedenen Tierarten zeigte, dass das Gen aus stark und weniger stark konservierten Bereichen besteht. Die von Meyer R. *et al.* (1995) zur Tierartendifferenzierung verwendeten Primern binden an den stärker konservierten Bereichen des Gens. Vergleiche von DNA-Sequenzen aus Datenbanken zwischen Tierarten, die als Lebensmittel relevant sind, zeigen an den Primerbindungsstellen einige Sequenzunterschiede. Dadurch kommt es bei Verwendung dieser Universalprimer bei einigen Tierarten zu Mismatches. Um dies zu verhindern, wurden die Primer Cytb 1f-WO und Cytb 2r-WO, die jeweils eine Mischung von Primern mit unterschiedlicher DNA-Sequenz an einigen Nukleotidpositionen darstellen, entwickelt. Durch die unvollständige Bindung von Primern an die Zielsequenz kann es zu einer Verschlechterung der PCR-Effizienz kommen, die bei der Endpunktbetrachtung im Agarosegel hier nicht zu beobachten war. Bei der Verwendung von Primern in der Real-Time-PCR macht sich eine schlechte PCR-Effizienz jedoch durch erhöhte Zyklenzahl bemerkbar, an der ein Signal detektierbar wird.

Zwischen verschiedenen Tierarten sind in den variableren Bereichen zahlreiche Punktmutationen zu finden. Die Sequenzierung großer Teile des *cytB*-Gens von Haus- und Wildschweinproben zeigt hingegen, dass die Sequenzunterschiede innerhalb einer Art in diesem Gen nur sehr gering sind.

Bei allen im *cytB*-Gen gefundenen Sequenzunterschieden handelt es sich um Punktmutationen mit Transition. In dem 963 Bp langen sequenzierten Abschnitt konnten acht Positionen identifiziert werden, die innerhalb der Art *Sus scrofa* polymorph sind. Lediglich einer dieser Sequenzunterschiede führt jedoch zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, alle anderen Basenaustausche fanden nur an Wobble-Positionen statt, siebenmal an der dritten Triplettposition, einmal an der ersten. Nur der Basenaustausch an Position 235 des *cytB*-Gens, bewirkt eine Änderung der Aminosäuresequenz. Diese Mutation liegt neben dem Basenaustausch an Position 234, der durch das Restriktionsenzym *Hinf* I zu einem Schnitt führt. Vier der 31 sequenzierten Wildschweine wiesen das Codon GTT auf, das für Valin codiert, während ATT für Isoleucin codiert. Dieser Teil des CytB-Proteins mit dem Aminosäureaustausch an Position 79 liegt in der Zellmembran (Brasseur *et al.*, 1996). An dieser Stelle wirkt sich eine Änderung der Aminosäure-Sequenz weniger stark auf die

Funktionsfähigkeit des Proteins aus als eine Änderung oberhalb der Zellmembran. Diese Abweichung trat sowohl bei männlichen wie auch bei einem weiblichen Wildschwein auf. Drei Tiere stammen aus der gleichen Region in Bayern, das vierte aus Brandenburg. Es handelt sich hierbei also nicht um individuelle Mutationen sondern um SNPs, die eine größere Verbreitung unter den Wildschweinen aufweist. Die Sequenzabweichungen des Hausschweins Nr. 5 sind auffällig gehäuft.

Für einen Teil der Wildschweine aus dem Land Brandenburg war der genaue geographische Ort der Erlegung bekannt, so dass neben den Unterschieden über räumlich weit auseinander liegende Gebiete auch die Unterschiede in einem zusammenhängenden Gebiet betrachtet und verglichen werden konnten.



Bei der in der Literatur beschriebenen Methode zur Differenzierung von Haus- und Wildschwein erfolgt die Unterscheidung über den Schnitt des Restriktionsenzym *HinfI* innerhalb des 359 Bp langen *cytB*-Amplifikats. Die RFLP-Analyse ergab, dass nur 21 % der untersuchten 73 Wildschweine diese Erkennungssequenz aufweisen und damit von Hausschweinen zu unterscheiden sind (Butschke *et al.*, 1999a). Die Sequenzierung des *cytB*-Gens hat gezeigt, dass bei den übrigen Wildschweinen eine Basensubstitution von C zu T die Restriktion verhindert. Durch die Sequenzierung großer Bereiche des *cytB*-Gens sind zwei weitere Mutationen gefunden worden, die ebenfalls nur bei Wildschweinen auftreten und damit die Anzahl an differenzierbaren Individuen über das *cytB*-Gen erhöhen.

Abbildung 81: Herkunft der Proben aus Brandenburg und ihr *HinfI*-Schnittverhalten:
● = ungeschnitten, ■ = geschnitten

Obwohl das *cytB*-Gen zu den stark konservierten Genen gehört, da die durch die Aminosäuresequenz festgelegte Faltung des Cytb-Proteins sehr wichtig für seine Funktion ist, sind Punktmutationen an einer Wobble-Position nicht auszuschließen. Bei der Entwicklung einer DNA-analytischen Methode zur Tierartendifferenzierung sollte dies berücksichtigt werden, da bei der RFLP-Analytik diese an Wobble-Positionen häufigen Sequenzunterschiede bei der gleichen Art, Form oder Rasse zu unterschiedlichen RFLP-Mustern führen und dadurch die Tierart nicht korrekt identifiziert werden kann. Bei der RFLP-Analytik ist die Einbeziehung von Wobble-Positionen unvermeidbar, da die Restriktionsenzyme in der Regel längere Erkennungssequenzen als 2 Basen aufweisen. Somit ist es sinnvoll, jeweils zwei für eine Tierart spezifisch schneidende Restriktionsenzyme mit unterschiedlichen Erkennungssequenzen zu verwenden.

Die Sequenzierung des von Rolf Meyer *et al.* (1995) für die Tierartendifferenzierung verwendeten 359 Bp langen *cytB*-Abschnitts zeigt, dass die Erkennungssequenz des zur Differenzierung der Schweine von den anderen Tierarten verwendete Restriktionsenzym *AluI* bei allen Schweinen vorhanden ist. Die Erkennungssequenz von *AluI*, ACGT liegt an Position 183-186 des Gens und führt zu Fragmenten der Größe 115 und 244 Bp. Dieser Bereich ist somit bei allen untersuchten Individuen, Hausschweinrassen und Wildschweinen hoch konserviert.

1.3.2 D-LOOP

Ein Vergleich der DNA-Sequenzen von Tieren verschiedener Arten zeigt große Unterschiede auf. Neben zahlreichen Punktmutationen sind viele Deletionen/Insertionen von mehr als 10 Bp vorhanden, die sich für eine Differenzierung von Tierarten gut eignen. Da der D-Loop ein nicht-codierender Bereich im mitochondrialen Genom ist, können Mutationen in diesem Bereich nach heutigen Erkenntnissen ohne Folgen für die Lebensfähigkeit des Individuums auftreten. Dadurch gehört dieser Bereich zu den variabelsten DNA-Bereichen bei den Säugetieren. Dieser Annahme folgend, sollte in diesem Bereich der größte Unterschied zwischen zwei Unterarten auftreten. Bei Pferden war es möglich, verschiedene Rassen über den D-Loop voneinander zu unterscheiden (Ishida *et al.*, 1994; Jansen *et al.*, 2002). Die Sequenzierung des kompletten D-Loop-Bereichs bei Haus- und Wildschweinen zeigte jedoch keine Deletionen oder über Punktmutationen hinausgehende Sequenzunterschiede (Butschke *et al.*, 1999b). Bei den neun sequenzierten Haus- und fünf Wildschweinen treten im D-Loop insgesamt 15 Mutationen auf, von denen sechs als Marker geeignet erscheinen. Bei nur zwei dieser Marker findet man eine polymorphe Situation bei den Wildschweinen, bei vier Markern sind Polymorphismen bei den Hausschweinen zu finden, während die andere Form jeweils homogen ist.

An sieben Positionen des D-Loops weist eine Unterart eine einheitliche Nukleinsäure auf, während die andere Form eine Mischung von zwei Nukleinsäuren aufweist. Dabei ist die Heterogenität bei den Hausschweinen im Verhältnis 10:3 größer als bei den Wildschweinen, was aber aufgrund der geringen Anzahl an sequenzierten Individuen nicht statistisch abgesichert ist. Unter allen Punktmutationen des sequenzierten D-Loop Bereichs der Schweine ist das Verhältnis von Transitionen (Purin-Purin bzw. Pyrimidin-Pyrimidin-Austausch) zu Transversionen (Pyrimidin-Purin-Austausch) mit 0,4 umgekehrt zu dem, was in codierenden Genen mit einer mittleren Austauschrate Transition / Transversion von 25 zu erwarten ist (Excoffier und Yang, 1999; Bielawski *et al.*, 2000).

Die Untersuchung weiter Teile der mitochondrialen DNA-Bereiche des Cytochrom b-Gens und der D-Loop-Region sowie des chromosomalen Melanocortin-1-Rezeptor-Gens zeigen, dass zwischen den Subspezies *Sus scrofa scrofa* und *Sus scrofa* f. *domesticus* nur Sequenzunterschiede auf der Basis von Punktmutationen zu finden sind. Die Deletion/Insertion größerer Bereiche, die hinsichtlich der größeren analytischen Sicherheit zu bevorzugen wären, sind nicht vorhanden.

Die hier entwickelte Methode basiert daher auf der Analyse von zwei nahe beieinander liegenden Punktmutationen. Während beide Punktmutationen in der RFLP-Analytik einzeln

nur bei einem Teil der untersuchten Proben eine Zuordnung erlaubt, lässt die Kombination beider RFLP-Analysen bei mehreren Proben eine Differenzierung zwischen Haus- oder Wildschweinproben zu.

Diese RFLP-Analytik ist durch die Entwicklung Schwein-spezifischer Primer mit einem kleineren Amplifikationsbereich und deutlich zu unterscheidenden Restriktionsfragmenten für die Routineanalytik vorbereitet worden. Ferner sind Sonden, die sich im Bereich der Punktmutationen anlagern, entwickelt worden. Diese ermöglichen es, in einer einfach durchzuführenden Real-Time-PCR mit dem TaqMan[™]-System von Applied Biosystems oder dem HybProbe-System[™] von Roche Haus- und Wildschwein zu differenzieren. Dies erfolgt über eine Schmelzpunktanalyse in diesen Geräten nach dem PCR-Lauf. Als Bestätigung des Befundes kann bei Bedarf mit den PCR-Amplifikaten ebenfalls eine RFLP-Analytik mit den beschriebenen Enzymen angeschlossen werden.

1.3.3 MC1R-GEN

Die Prüfung der von Kijas *et al.* (1998) beschriebenen unterschiedlichen Genotypen zwischen Haus- und Wildschweinen, die mit der Fellfarbe korrelieren sollen, zeigte, dass bei den untersuchten Hausschweinen ein einheitlicher Genotyp vorhanden ist, während bei Wildschweinen drei Genotypen gefunden wurden. Neben dem Wildtyp kommt der Genotyp vor, der bei Hausschweinen, weiterhin gibt es bei einigen Wildschweinen eine heterozygote Situation, so dass ein Allel den von Kijas beschriebenen Genotyp der Wildschweine enthält, das andere Allel das der Hausschweine. Bei den untersuchten Wildschweinen handelt es sich nach Begutachtung der Jäger und der veterinärmedizinischen Untersuchung eindeutig um Wildschweine und nicht um Kreuzungen. Somit sind diese Tiere aufgrund ihres Aussehens als Wildschweine in den Verkehr zu bringen. Sollten diese Tiere aus Kreuzungen mit domestizierten Schweinen in den zurückliegenden 500 Jahren zurückgegangen sein, so haben diese lebensmittelrechtlich betrachtet keine Relevanz. Demgegenüber ist die künstlich durchgeführte Kreuzung von weißen Hausschweinen mit Wildschweinen eindeutig am Phänotyp zu erkennen und nicht mehr als Wildschwein zu bezeichnen.

Die Mutation an Nukleotid-Position 242 des *mc1r*-Gens hat Auswirkungen auf den Phänotyp des Schweins. Der Austausch der beim Wildschwein vorhandenen Aminosäure Asparaginsäure durch Asparagin beim Hausschwein könnte aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Gruppen einen Einfluss auf die Struktur und damit auf die Funktionalität des Proteins haben (Newton *et al.*, 2000). Sollte das in dem Maße der Fall sein, dass es eine Änderung der Fellfarbe bewirkt, so kann dies nicht der einzig maßgebliche Prozess dafür sein, da auch einige Wildschweine diese Mutation aufweisen. Wie in der Einleitung erläutert, ist bekannt, dass zahlreiche Gene an der Entstehung von Haut- und Fellfarbe beteiligt sind, so dass Mutationen auf verschiedenen Genen zu einer Albinoförmigkeit führen können (Marklund *et al.*, 1998). Weiterhin steht die Untersuchung des Einflusses von regulatorischen Elementen bzw. epigenomischen Informationen (Hirobe und Abe, 1999) auf die Ausprägung der Merkmale im Vordergrund der künftigen Forschung.

Über diesen Marker lassen sich nach diesen Untersuchungen über den homo- oder heterozygot vorhandenen Wildschwein-spezifischen Genotyp 96 % der Wildschweine als solche identifizieren, d.h. von Hausschweinen differenzieren. Hausschweine können über diesen Marker nicht sicher als solche identifiziert werden, da einige Wildschweine den gleichen Genotyp aufweisen.

Die Untersuchungen zum *mc1r*-Gen zeigen, dass selbst Marker, die zur Änderung der Aminosäuresequenz führen und in Verbindung zu dominanten Änderungen des äußeren

Erscheinungsbildes führen, nicht einheitlich innerhalb einer Art, Form oder Rasse sein müssen. Die Robustheit solcher gruppenspezifischen DNA-Sequenzen muss daher an zahlreichen Individuen einer Subspezies aus verschiedenen geographischen Regionen getestet werden. Die Verwendung mehrerer Marker zur Erlangung einer höheren analytischen Sicherheit ist empfehlenswert bzw. für bestimmte Aussagen über die Probenzusammensetzung unabdingbar.

1.3.4 TYR-GEN

Im dem sequenzierten Abschnitt des *tyr*-Gens von fünf Hausschweinen und sieben Wildschweinen wurden fünf Punktmutationen gefunden, die ausschließlich bei zwei Hausschweinen auftreten. Eine Untersuchung der Codons ergab, dass alle Mutationen an Wobble-Positionen liegen, die Aminosäuresequenz aller Schweine daher identisch ist. Es handelt sich somit um ein stark konserviertes Gen, das bei dem Verlust der Fellfärbung der Hausschweine keine Rolle spielt. Diese Mutationen stellen daher insgesamt keine potenten Marker für die Haus- und Wildschweindifferenzierung dar.

1.3.5 IMMUNOREZEPTOR DAP10-GEN

Beim *dap10*-Gen wurden sowohl codierende als auch nicht-codierende Abschnitte sequenziert und zwischen Haus- und Wildschweinen verglichen. Dabei zeigten auch die Bereiche des Introns eine sehr hohe Konservierung der Sequenz innerhalb der Art *Sus scrofa*. In umgekehrter Leserichtung zum *dap10*-Gen liegt durch ein kurzes Intron getrennt das *dap12*-Gen. Laut Literatur (Yim *et al*, 2001) gibt es jedoch keine Überschneidungen der Gene, so dass eine Funktion der Introns bisher nicht bekannt ist. Die große Sequenzhomologie zwischen Haus- und Wildschweinen in diesem nicht-codierenden und damit keinem Selektionsdruck ausgesetzten DNA-Bereich zeigt neben dem D-Loop die nahe Verwandtschaft und die damit verbundene Schwierigkeit zur Differenzierung beider Formen.

1.3.6 MIKROSATELLIT S0602

Die Wildschweine weisen im Schnitt mehr CA-Wiederholungen als die Hausschweine auf, wobei die Heterogenität bei den Hausschweinen größer ist. Die Repeat-Anzahl bzw. die Länge dieses Bereiches ist somit nicht für eine Differenzierung der Formen geeignet. Dieser Mikrosatellit weist keine Sequenzunterschiede auf, die innerhalb einer Form einheitlich, zwischen den Formen aber unterschiedlich ist.

Drei der vier sequenzierten Wildschweine weisen an Position 264 des Mikrosatelliten innerhalb des repetitiven Abschnitts eine C-A Substitution auf, den kein Hausschwein aufweist und der somit als Marker für die Unterscheidung Hausschwein/Wildschwein

geeignet ist. In dem nicht-repetitiven Bereich sind an den drei Positionen 92, 501 und 511 die Wildschwein-Sequenzen identisch, während jeweils fünf der sieben sequenzierten Hausschweine eine abweichende Sequenz haben. Da hier die Wildschwein-Sequenzen homogen sind, ermöglichen diese Marker im Gegensatz zu denen im *cytB*-Gen oder dem *mclr*-Gen eine Identifizierung der Hausschweine, während Wildschweine nicht eindeutig identifiziert werden können. Diese Marker stellen somit eine gute Ergänzung zu den zuvor genannten dar.

Dieser Mikrosatellit zeigt im Vergleich zu den Protein-codierenden DNA-Bereichen eine größere Häufigkeit von Punktmutationen. Diese sind ebenfalls unter Haus- und Wildschweinen gleichmäßig verteilt. Da dieser Sequenzbereich weniger konserviert erscheint, ist im Vergleich zu den konservierten Sequenzabschnitten das Risiko für die Mutation eines Markers und damit den Verlust der Information größer.

1.4 RAPD-Analyse

Verwendet wurden 10 Bp lange Primer, die nur zu einem kleinen Teil der genomischen DNA-Sequenz komplementär sind. Sie binden daher in nicht vorhersehbarer Weise nur 10-100 mal so an die DNA, dass ein Amplifikat entsteht. Um alle Sequenzvarianten abzudecken, müssten über eine Millionen verschiedene Primer getestet werden. Die ausgewählten Primer erzeugten mit der aus Schweinen extrahierten DNA jeweils 20-30 Amplifikate unterschiedlicher Größe.

Von den mit verschiedenen Primern bzw. Primerkombinationen entstandenen zahlreichen Banden waren nur wenige zwischen den Individuen unterschiedlich. Es konnten keine Banden gefunden werden, die innerhalb einer Form gleich, zwischen Haus- und Wildschweinen jedoch unterschiedlich waren und somit als Marker für die Differenzierung hätten dienen können. Auf die Sequenzcharakterisierung der DNA-Fragmente wurde daher verzichtet. Die geringe Heterogenität zwischen den Formen und die im Vergleich dazu große Heterogenität innerhalb der Formen, die bei den Sequenzvergleichen deutlich wurden, bestätigt sich auch in der RAPD-Analytik. Bei der RAPD-Analytik ist es nicht zu erwarten, dass einzelne Basenunterschiede in der Primerbindungsregion zum Erscheinen oder Ausbleiben von Banden führen, jedoch zu einer unterschiedlichen Effizienz der PCR. So sind einige DNA-Bereiche unterschiedlich stark amplifiziert worden, was sich in verschiedenen Bandenintensitäten im Agarosegel ausdrückt. Mehrere Sequenzunterschiede sowie Deletionen bzw. Insertionen würden mit großer Wahrscheinlichkeit zu unterschiedlichen Banden führen und wären für diese Arbeit von großem Interesse. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden und zeigt, dass die überwiegenden Sequenzunterschiede auf Punktmutationen beruhen. Die RAPD-Analyse konnte daher nicht zur Identifizierung von Markern herangezogen werden.

Aktuelle Untersuchungen über die genetische Diversität zeigen, dass Gene, die für phänotypische Unterschiede verantwortlich sind, auf deren Basis eine Einordnung in Rassen vorgenommen wird, zwischen den Rassen stärker variieren als andere Gene (Feldman *et al.*, 2003). So reflektieren auch die starken phänotypischen Unterschiede zwischen Haus- und Wildschwein nicht die Unterschiede des gesamten Genoms.

1.5 Übersicht der Marker

In der Tabelle 66 sind die durch Sequenzierung festgestellten Polymorphismen aufgeführt, die bei einer großen Anzahl an untersuchten Individuen einer Form vorkommen, während sie in der anderen Form einheitlich nicht vorkommen. Es handelt sich jeweils um isolierte Punktmutationen in Form von Substitutionen. Diese SNPs können in Kombination mit anderen SNPs als Marker für die jeweilige Form verwendet werden (Butschke *et al.*, 2001). Weiterhin sind kommerziell erhältlich Restriktionsenzyme angegeben, mit der sich die Punktmutationen identifizieren lassen. Wo keine Restriktionsenzyme verfügbar sind, lassen sich die SNPs nur über geeignete Sonden oder durch Sequenzierung nachweisen.

Tabelle 66: Übersicht über die Marker zur Differenzierung von Haus- und Wildschweinen.
Aufgeführt ist, wie häufig bei den untersuchten Haus- bzw. Wildschweinen die jeweiligen Polymorphismen vorkommen und mit welchen kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen diese differenzierbar sind.

DNA-Sequenz	Position	Basensubstitution	Restriktionsenzym / Erkennungssequenz	HS	WS
D-Loop	276	C/T	<i>Eco57MI</i> CTGRAG(N)16	T (78 %) C (22 %)	T (100 %)
D-Loop	279	C/T	<i>AseI</i> ATTAAT	C (100 %)	C (40 %) T (60 %)
D-Loop	306	C/T	<i>Tsp509I</i> AATT	C (50 %) T (50 %)	C (100 %)
D-Loop	323	T/C	<i>BfaI</i> CTAG	C (56 %) T (44 %)	C (100 %)
D-Loop	390	C/T	<i>Tsp509I</i> AATT	C (100 %)	C (40 %) T (60 %)
<i>mc1R</i>	93	C/T	<i>BsaJI</i> CCNNGG	C (100 %)	C (78 %) T (22 %)
<i>mc1R</i>	242	A/G	<i>BtgI</i> CCRYGG	A (100 %)	A (4 %) A+G (15 %) G (81 %)
<i>cytB</i>	127	T/C	<i>HpyCH4III</i> ACNGT	T (100 %)	T (68 %) C (32 %)
<i>cytB</i>	234	T/C	-	T (100 %)	T (79 %) C (21 %)
<i>cytB</i>	235	A/G	-	A (100 %)	A (87 %) G (13 %)
MS0602	92	A/T	-	T (29 %) A (71 %)	T (100 %)
MS0602	501	C/T	<i>BsrDI</i> CATTGC	T (29 %) A (71 %)	T (100 %)
MS0602	511	G/A	<i>HpyCH4IV</i> ACGT	A (29 %) G (71 %)	A (100 %)

1.6 Real-Time-PCR

Unter Verwendung von Sybr[®] Green I bewirkt ein einzelner Basenaustausch nur eine schwache Änderung der Schmelztemperatur. Mehrere Austausche können sich sogar in ihrer Wirkung aufheben. Die Temperaturunterschiede lagen bei Proben mit unterschiedlicher DNA-Sequenz in der Regel unterhalb von 1 °C, maximal bei 2 °C. Ein Versuch mit unterschiedlichen Magnesiumchloridkonzentrationen zeigte, dass ähnliche Schwankungen bereits durch unterschiedliche Salzkonzentration in der Probe entstehen können.

Ein spezifischer Nachweis einer Mutation über eine Schmelzkurve ist daher nur über eine Hybridisierungsprobe möglich. Diese Sonde bestehend aus zwei Teilen - Absorber und Reporter - ermöglicht die gezielte Identifikation einer abweichenden Basensequenz in einem kleinen DNA-Bereich. Um DNA-Sequenzunterschiede eines Amplifikats durch Schmelzpunktanalytik bestimmen zu können, muss der zu erwartende Basenaustausch eine möglichst große Änderung des Schmelzpunktes bewirken. Beim Aufschmelzen eines ca. 300 Bp langen Amplifikats wird die Änderung der Schmelztemperatur bei einem einzigen Basenaustausch nur sehr gering ausfallen und in der Regel innerhalb des Rauschens ($\Delta T < 1$ °C) liegen. Legt man jedoch eine nicht zu große Sonde auf den DNA-Bereich, in dem die Punktmutation auftritt, kann die Änderung der Schmelztemperatur mehrere Grad Celsius betragen. Durch Veränderung der Länge und der Position der Sonde, sowie der Wahl des Zielstrangs (sense oder anti-sense) kann die Schmelztemperatur optimiert werden. Es müssen jedoch alle relevanten Basenaustausche in dem Sondenbindungsbereich liegen oder zwei verschiedene Sonden verwendet werden. Die Sondenbindung wird erst bei zwei Fehlpaarungen mit der Ziel-DNA deutlich destabilisiert.

1.7 Ausblick

1.7.1 QUANTIFIZIERUNG

Die Möglichkeit einer Quantifizierung des Anteils Hausschwein in einem Wild-Produkt erscheint bisher nicht greifbar. Mitochondriale Systeme sind für die Quantifizierung in zusammengesetzten Produkten nur wenig geeignet, da Mitochondrien je nach Gewebeart unterschiedlich oft pro Zelle vorhanden sind und Gewebe damit unterschiedliche Anzahl an DNA-Kopien pro Zelle aufweisen. Gene, bei denen die Differenzierung über heterozygote Situationen erfolgt, sind für die Quantifizierung ebenfalls nicht geeignet, da nicht zwischen einer Mischung von zwei Tieren mit unterschiedlichen homozygoten Allelen und einer Mischung von homozygoten mit heterozygoten Tieren unterschieden werden kann. Somit

sind die Ergebnisse bei einer Allel-Diskriminierungsanalyse hinsichtlich der Fleischanteile der Tiere nicht interpretierbar. Bei repetitiven single-copy Sequenzen ergibt sich das Problem, die für eine Quantifizierung mittels Real-Time-PCR notwendige Sonde spezifisch zu platzieren, da diese über die gesamte Länge der Repeats gehen müsste und somit in der Regel die tolerierbare Länge einer Sonde übersteigt.

1.7.2 SCHWEINE-GENOM-PROJEKT

Nach dem Humanen Genom Projekt wird gegenwärtig das Genom der ersten Nutztiere sequenziert, u.a. auch das Schweinegenom. Die Kenntnis weiterer DNA-Sequenzen wird die vergleichende Sequenzierung von Haus- und Wildschweinen erleichtern. Sie wird die Untersuchung einer großen Zahl an Individuen auf die Robustheit der potentiellen Marker jedoch nicht ersetzen. Die Identifikation der Mutationen, die für den so stark unterschiedlichen Phänotyp von Haus- und Wildschwein verantwortlich sind, wird diese Sequenzierung alleine nicht ermöglichen. Die Erforschung der Funktionen aller Gene, deren Zusammenwirken und Beeinflussung durch regulatorische Elemente oder andere nicht Protein-codierende Sequenzen wird noch lange Zeit in Anspruch nehmen (Francis *et al.*, 2003).

1.7.3 ROUTINEANALYTIK

Die Umsetzung eines Markers in eine robuste und in der Routine einfach anzuwendende Methode wird mit neuen Punktmutationen-detektierenden Systemen immer einfacher. Da die Diagnostik der SNPs in der Humanmedizin zur Identifizierung von Erbkrankheiten, entartetem Gewebe oder der Risikoabschätzung von Krankheiten von großem Interesse ist, wurden neue Methoden für diesen Zweck entwickelt. Dazu zählen z.B. die von Applied Biosystems entwickelten MGB-Sonden (Minor Groove Binder) oder Primersysteme, die nur bei vollständiger Sequenzübereinstimmung mit der Zielsequenz binden und ein PCR-Amplifikat ergeben. Weiterhin bietet die Microarray-Technologie die Möglichkeit, zahlreiche Marker auch in Form von SNPs parallel bestimmen zu können (Erdogan *et al.*, 2001).

LITERATUR

Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S und Akcali C (1999)

The melanocortin-1 receptor and human pigmentation
Annals of New York Academy of Sciences 885: 117-133

ADAC (2000)

ADAC-Magazin
Pressemitteilung

AgBiotechNet (2000)

Pig and Rice Genomes to be Sequenced
AgBiotechNet 15. Mai 2000

aid (1997)

Schweinerassen - Begleitheft zur Diaserie 7163
Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (aid)
e.V., Heft 3275/1997,

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K und Walter P (2002)

Molecular Biology of The Cell
4. Auflage, Garland Science, New York

Allmann M, Candrian U, Höfelein C und Lütthy J (1993)

Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods
assuring safety and quality of food
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 196: 248-251

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman DJ (1997)

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs
Nucleic Acid Research 25: 3389-3402

Andersson L (1997)

The use of a wild pig x domestic pig intercross to map phenotypic trait loci
Journal of Heredity 88: 380-383

Arakawa H, Tsuji A, Maeda M, Kamahori M und Kambara H (1997)

Analysis of single-strand conformation polymorphisms by capillary electrophoresis
with laser induced fluorescence detection
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 15: 1537-1544

Ashurst PR und Dennis MJ (1998)

Analytical methods of food authentication
Blackie Academic & Professional

Barker JSF (1994)

Animal breeding and conservation genetics
Conservation Genetics 68: 381-395

Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F und Heun M (1995)

Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley
Mol Gen Genet 249: 65-73

Behrens M, Unthan M, Brinkmann Y, Camps G und Latus N (1998)

Eine innovative PCR-Technik zum Nachweis von Tierarten in komplexen Fleisch- und
Wurstwaren am Beispiel von Huhn und Pute
Lebensmittelchemie 52: 69-70

- Behrens M, Unthan M, Brinkmann Y, Buchholz R und Latus N (1999)**
 Nachweis von Tierarten in erhitzten und komplexen Fleischerzeugnissen durch
 Tierart-spezifische PCR-Reaktionen
 Fleischwirtschaft 79: 97-100
- Beneke B und Hagen M (1998)**
 Eignung der PCR – Tierartennachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen
 Fleischwirtschaft 78: 1016-1019
- Benecke N (1994)**
 Der Mensch und seine Haustiere – Die Geschichte einer jahrtausendealten Beziehung
 Theiss Verlag, Stuttgart
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA und Wheeler DL (2000)**
 GenBank
 Nucleic Acids Research 28: 15-18
- Betz K, Waiblinger HU und Pietsch K (1998)**
 Differenzierung von Tierarten in Lebensmitteln mit Hilfe molekularbiologischer
 Methoden
 Posterpräsentation auf dem Lebensmittelchemikertag München
- BgVV (1997)**
 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG
 Beuth-Verlag GmbH, Berlin / Köln
- Bielawski JP, Dunn KA und Yang Z (2000)**
 Rates of Nucleotide Substitution and mammalian Nuclear Gene Evolution:
 Approximate and maximum-Likelihood Methods Lead to Different Conclusions
 Genetics 156: 1299-1308
- Björklund E, Pallaroni L und von Holst C (2001)**
 Method of Determination of Appropriate Heat Treatment of Animal Meal by
 Immunoassay Developed for Detection of Cooked Beef: Interlaboratory Study.
 Journal of AOAC International 84: 1839-1845
- Böhm M, Metze D, Schulte U, Becher E, Luger TA und Brzoska T (1999)**
 Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in
 situ
 Exp. Dermatol. 8: 453-461
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME und van der
 Noordaa J (1990)**
 Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids
 Journal of Clinical Microbiology 28: 495-503
- Brasseur G, Saribas AS und Daldal F (1996)**
 A compilation of mutations located in the cytochrome b subunit of the bacterial and
 mitochondrial bc1 complex
 Biochimica et Biophysica Acta 1275: 61-69
- Brehm (1996)**
 Brehms Tierleben
 Herder

Brenig B und Brem G (1992)

Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (ryr1)

Federation of European Biochemical Societies Letters 298: 277-279

Brodmann PD, Nicholas G, Schaltenbrand P und Ilg EC (2001)

Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool

Eur Food Res Technol 212: 491-496

Broll H, Butschke A, Spiegelberg A, Wagner U, Zagon J und Schauzu M (1999)

Untersuchungen zur Tier- und Pflanzenartendifferenzierung

Lebensmittelchemie 53: 154

Buntjer JB, Lenstra JA und Haagsma N (1995)

Rapid species identification in meat by using satellite DNA probes

Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 201: 577-582

Buntjer JB und Lenstra JA (1998)

Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 21: 121-127

Buntjer JB, Lamine A, Haagsma N und Lenstra JA (1999)

Species identification by oligonucleotide hybridisation: the influence of processing of meat products

Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 53-57

Burgener M und Hübner P (1998)

Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis

Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 207: 261-263

Buscà R und Ballotti R (2000)

Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation

Pigment Cell Research 13: 60-69

Butschke A, Schauzu M, Bögl KW und Broll H (1999a)

Probleme bei der Differenzierung von Wildschwein und Hausschwein über PCR/RFLP Analytik

Lebensmittelchemie 53: 67

Butschke A, Schauzu M und Broll H (1999b)

Possibilities and limitations of a method to differentiate between meat products derived from game and breeds

Posterpräsentation des 5th symposium of food authenticity in Nantes

Butschke A, Schauzu M und Broll H (2001)

DNA-analytische Differenzierung von Haus- und Wildschweinen in verarbeiteten Lebensmitteln

Lebensmittelchemie 55: 20

Candrian U (1994)

Die Polymerase-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 85: 704-718

Charlesworth B, Sniegowski P und Stephan W (1994)

The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes

Nature 371: 215-220

Chen H und Leibenguth F (1995)

Restriction patterns of mitochondrial DNA in Japanese wild boar and German Landrace

Comp. Biochem. Physiol. 110B: 725-728

Clayton DA (1987)

Nuclear gene products that function in mitochondrial DNA replication

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 317: 473-478

Clayton DA (2000)

Transcription and replication of mitochondrial DNA

Hum. Reprod. Suppl 2: 11-17

Collins FS, Green ED, Guttmacher AE und Guyer MS (2003)

A vision for the future of genomics research

Nature 422: 835-847

Collura RV und Stewart CB (1995)

Insertions and duplications of mitochondrial DNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids

Nature 378: 485-489

Collura RV, Auerbach MR und Stewart C-B (1996)

A quick, direct method that can differentiate expressed mitochondrial genes from their nuclear pseudogenes

Current Biology 6: 1337-1339

Condie A, Eeles R, Borresen A-L, Coles C, Cooper C und Prosser J (1993)

Detection of point mutations in the p53 gene: comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques

Human Mutation 2: 58-66

Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C und Kesterson RA (1996)

The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation

Recent progress in Hormone research 51: 287-319

Das P, Meyer L und Seyfert HM (1996)

Structure of the growth hormone-encoding gene and its promoter in mice

Elsevier Science 169: 209-213

Davoli R, Costosi E, Nanni Costa L, Tagliavini J und Russo V (1995)

Hinc II and Hae III RFLPs in the porcine mtDNA D-loop region

Animal Genetics 26: 205

De Boer SH, Ward LJ, Li X und Chittaranjan S (1995)

Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of blotto

Nucleic Acid Research 23: 2567-2568

Dodgson JB, Cheng HH und Okimoto R (1997)

DNA marker technology: a revolution in animal genetics

Poultry Science 76: 1108-1114

Dorroch U (2001)

Isolierung und Charakterisierung merkmalsassoziierter exprimierter DNA-Sequenzen mittels 'mRNA-differential display' in ausgewählten Geweben bei Rind und Schwein
Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Dufresne C, Mignotte F und Guéride M (1996)

The presence of tandem repeats and the initiation of replication in rabbit mitochondrial DNA
Eur. J. Biochem. 235: 593-600

Edvardsson U, Alexandersson M, Brockenhuus von Lowenhielm H, Nystrom AC, Ljung B, Nilsson F und Dahllof B (1999)

A proteome analysis of liver from obese (ob/ob) mice treated with the peroxisome proliferator WY14,643
Electrophoresis 20: 935-942

Elphinstone MS und Baverstock PR (1997)

Detecting Mitochondrial Genotypes by Temperature Gradient Gel and Heteroduplex Analysis
BioTechniques 23: 982-986

Erdogan F, Kirchner R, Mann W, Ropers H-H und Nuber UA (2001)

Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays
Nucleic Acids Research 29: e36

Excoffier L und Yang Z (1999)

Substitution Rate Variation Among Sites in Mitochondrial Hypervariable Region I of Humans and Chimpanzees
Molecular Biology Evolution 16: 1357-1368

Feldman MW, Lewontin RC und King M-C (2003)

A genetic melting-pot
Nature 424: 374

Fey MF (1989)

DNS-fingerprints und hypervariable Regionen: genetische Marker mit zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten in Medizin und Biologie
Schweizerische medizinische Wochenzeitschrift 119: 815-825

Forbes SH, Hogg JT, Buchanan FC, Crawford AM und Allendorf FW (1995)

Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and Bighorn Sheep
Molecular Biological Science 12: 1106-1113

Frengen E, Thomsen P, Kristensen T, Kran S, Miller R und Davies W (1991)

Porcine SINEs: Characterization and use in species-specific amplification
Genomics 10: 949-956

Frýdl V und Závodská H (1992)

Anmerkungen zum mitochondrialen Genom
Acta histochemica, Supplementband 42: 283-291

Gadaleta G, Pepe G, DeCandia G, Quagliariello C, Sbisà E und Saccone C (1989)

The complete nucleotide sequence of the rattus norvegicus mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates
Journal of Molecular Evolution 28: 497-516

- Ghivizzani SC, Mackay, SLD, Madsen CS, Laipis PJ und Hauswirth WW (1993)**
Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region
Journal of Molecular Evolution 37: 36-47
- Gilchrist DPD, Darlington L und Smith PF (1996)**
An in vitro investigation of the effects of the ACTH/MSH (4-9) analogue, Org 2766, on guinea pig medial vestibular nucleus neurons
Peptides 17: 681-688
- Giuffra E, Evans G, Törnsten A, Wales R, Day A, Looft H, Plastow G und Andersson L (1999)**
The belt mutation in pigs is an allele at the dominant white (I/KIT) locus
Mammalian Genome 10: 1132-1136
- Giuffra E, Kijas JHM, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon J-T und Andersson L (2000)**
The Origin of the Domestic Oig: Independent Domestication and Subsequent Introgression
Genetics 154: 1785-1791
- Glavac D und Dean M (1993)**
Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations
Human Mutation 2: 404-414
- Gouin N, Grandjean F, Bouchon D, Reynolds JD und Souty-Grosset C (2001)**
Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers
Heredity 87: 80-87
- Hall LM, Jones DS und Wood BA (1998)**
Evolution of the gibbon subgenera inferred from cytochrome b DNA sequence data
Mol. Phylogenet. Evol. 10: 281-286
- Haskell-Luevano C, Rosenquist Å, Souers A, Khong KC, Ellman JA und Cone RD (1999)**
Compounds that activate the mouse melanocortin-1 receptor identified by screening a small molecule library based upon the β -turn
J. Med. Chem. 42: 4380-4387
- Hellebrand M, Nagy M und Mörsel J-T (1998)**
Determination of DNA traces in rapeseed oil
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 206: 237-242
- Hirobe T und Abe H (1999)**
Genetic and epigenetic control of the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes in culture
Pigment Cell Research 12: 147-163
- Hofmann K (1989)**
Vergleichende Untersuchungen von deutschem und australischem Wildschweinfleisch
Fleischwirtschaft 69: 1558-1560
- Hofmann K (1997)**
Nachweis der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen
Fleischwirtschaft 77: 151-154

-
- Holland PM, Abramson RD, Watson R und Gelfand DH (1991)**
Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280
- Huang Y, Shi X und Zhang Y (1999)**
Mitochondrial genetic variation in Chinese pigs and wild boars
Biochemical Genetics 37: 335-343
- Irwin DM, Kocher TD und Wilson AC (1991)**
Evolution of the cytochrome b gene of mammals
Journal of Molecular Evolution 32: 128-144
- Ishida N, Hasegawa T, Takeda K, Sakagami M, Onishi A, Inumaru S, Komatsu M und Mukoyama H (1994)**
Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA
Animal Genetics 25: 215-221
- Jansen T, Forster P, Levine MA, Oelke H, Hurles M, Renfrew C, Weber J und Olek K (2002)**
Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10905-10910
- Janssen FW, Hägele GH, Buntjer JB und Lenstra JA (1998)**
Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes
Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 21: 115-120
- Jemmi T und Schlosser H (1993)**
Tierartbestimmung aus mariniertem und erhitztem mariniertem Fleisch mittels isoelektrischer Fokussierung
Fleischwirtschaft 73: 600-602
- Jiang ZH und Gibson JP (1998)**
A PCR Amplified Product Length Polymorphism (AFLP) Marker at the Porcine Glucosephosphate Isomerase Locus Shows Between-Population Frequency Variation
American Society of Animal Science 76: 1718-1719
- Johansson M, Ellegren H, Marklund L, Gustavsson U, Ringmar-Cederberg E, Andersson K, Edfors-Lilja I und Andersson L (1992)**
The gene for dominant white color in the pig is closely linked to ALB and PDGFRA on Chromosome 8
Genomics 14: 965-969
- Johansson Moller MJ, Chaudhary R, Hellmén E, Chowdhary B und Andersson L (1997)**
Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the KIT gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor
Mammalian Genome 7: 822-830
- Kang Y-K, Koo D-B, Park JS, Choi Y-H, Kim H-N, Chang W-K, Lee K-K und Han Y-M (2001)**
Typical Demethylation Events in Cloned Pig Embryos
The Journal of Biological Chemistry 276: 39980-39984
- Karlson P (1988)**
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 13. Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart / New York
- Kaufmann R (1995)**
Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology
-

-
- J Biotechnol 41: 155-175
- Kijas JMH, Wales R, Törnsten A, Chardon P, Moller M und Andersson L (1998)**
Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs
Genetics 150: 1177-1185
- Kim KS, Larsen N, Short T, Plastow G und Rothschild MF (2000)**
A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits
Mammalian Genome 11: 131-135
- Kim KS, Yeo JS und Kim JW (2002)**
Assessment of genetic Diversity of korean Native Pig (Sus scrofa) using AFLP Markers
Genes Genet. Syst. 77: 361-368
- King TC und Low RL (1987)**
Mapping of control elements in the displacement loop region of bovine mitochondrial DNA
The Journal of Biological Chemistry 262: 6204-6213
- Kirkpatrick BW, Huff BM und Casas-Carrillo E (1993)**
Double-strand DNA conformation polymorphisms as a source of highly polymorphic genetic markers
Animal Genetics 24: 155-161
- Knott SA, Marklund L, Haley CS, Andersson K, Davies W, Ellegren H, Fredholm M, Hansson I, Hoyheim B, Lundström K, Moller M und Andersson L (1998)**
Multiple Marker Mapping of Quantitative Trait Loci in a Cross Between Outbred Wild Boar and Large White Pigs
Genetics 149: 1069-1080
- Korner A und Pawelek J (1982)**
Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin
Science 217: 1163-1165
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Barabant G und Grüters A (1998)**
Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMP mutations in humans
Nat. Genet. 19: 155-157
- Kurosawa Y, Tanaka K, Suzuki S und Oishi T (1984)**
Variations of blood groups observed in wild pig populations in Japan
Japanese Journal of Zootechnical Science 55: 209-212
- Laube I, Butschke A, Zagon J, Spiegelberg A, Schauzu M, Bögl K-W, Kroh LW, Broll H (2001)**
Nachweisverfahren für Rindfleisch in Lebensmitteln unter Anwendung der TaqMan™-Technologie. Bundesgesundheitsblatt 44: 326-330
- Laukner A (1998)**
Die Fellfarbe beim Hund
Tierärztliche Praxis 26: 49-54
- Lerner AB und Fitzpatrick TB (1950)**
Biochemistry of melanin formation
Physiol. Rev. 30: 91-126
- Lewin B (1997)**
Genes
Oxford University Press and Cell Press, Oxford / New York
-

-
- Lin CS, Sun YL, Liu CY, Yang PC, Chang LC, Cheng IC, Mao SJ und Huang MC (1999)**
Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla
Gene 236: 107-114
- Lin J-J, Kuo J, Ma J, Saunders JA, Beard HS, MacDonald MH, Kenworthy W, Ude GN und Matthews BF (1996)**
Identification of Molecular Markers in Soybean Comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA Mapping Techniques
Plant Molecular Biology Reporter 14: 156-169
- Lockley AK und Bardsley RG (2000)**
DNA-based methods for food authentication
Trends in Food Science & Technology 11: 67-77
- Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W und O'Brian SJ (1994)**
J Mol Evol 39: 174-190
- Maak S (2001)**
Untersuchungen zu Kandidatengenomen für Leistungseigenschaften und Erbfehler beim Schwein
Habilitationsschrift an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Malmheden Yman I, Eriksson A, Everitt G, Yman L und Karlsson T (1994)**
Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabeling
Food & Agricultural Immunology 6: 167-172
- Marklund S, Kijas J, Rodriguez-Martinez H, Rönstrand L, Funa K, Moller M, Lange D, Edfors-Lija I und Andersson L (1998)**
Molecular Basis for the Dominant White Phenotype in the Domestic Pig
Genome Research 8: 826-833
- Martinez I und Malmheden Yman I (1998)**
Species identification in meat products by RAPD analysis
Food Research International 31: 459-466
- Matthee CA und Robinson TJ (1996)**
Mitochondrial DNA differentiation among geographical populations of *Lepus capensis*, *Lepus sylvaticus*, *Lepus timidus*, *Lepus arvalis*, *Lepus lagomorphus*, *Lepus timidus*, *Lepus arvalis*, *Lepus lagomorphus*, *Lepus timidus*, *Lepus arvalis*, *Lepus lagomorphus*
Heredity 76: 514-523
- McCormick RJ, Collins DA, Field RA und Moore TD (1992)**
Identification of meat from game and domestic species
Journal of Food Science 57: 516-520
- McElhinney J, Downey G und O'Donnell (1999)**
Quantitation of Lamb Content in Mixtures with Raw Minced Beef Using Visible, Near and Mid-Infrared Spectroscopy
Journal of Food Science 64: 587-592
- Meyer G, Müller M, Kruse L, Rüggeberg H, Ketschau G und Hildebrandt A (1994)**
DNA-Sonden zur Tierartidentifizierung in verarbeiteten Lebensmitteln
Fleischwirtschaft 74: 1237-1238
-

-
- Meyer G, Kruse L, Rüggeberg H und Müller M (1997)**
Bestimmung der Tierart in Lebensmitteln. Erfahrungen mit DNA-Sonden- und PCR-Tests. Einsatz von basensequenzspezifischen DNA-Liganden
BgVV-Hefte, Heft 9, 15-24
- Meyer R, Candrian U und Lüthy J (1993)**
Tierartbestimmung und Sojanachweis in erhitzten Fleischprodukten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 84: 112-121
- Meyer R, Candrian U und Lüthy J (1994)**
Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction
Journal of AOAC International 77: 617-622
- Meyer R, Höfelein C, Lüthy J und Candrian U (1995)**
Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food
Journal of AOAC International 78: 1542-1551
- Meyer R, Chardonnens F, Hübner P und Lüthy J (1996)**
Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 203: 339-344
- Meyer W, Saglam M, Schönfeld C und Tanyolaç, A (1998)**
Die Geschichte der Türkischen Angoraziege mit Bemerkungen zur wilden Stammform der Hausziege
Tierärztliche Praxis 26: 1-11
- Mickelson JR, Fnuadson CM und Kennedy CFH (1992)**
Structural and functional correlates of a mutation in the malignant hyperthermia-susceptible pig ryanodine receptor
Federation of European Biochemical Societies 301: 49-52
- Miller JR und Archibald AL (1993)**
5' and 3' SINE-PCR allows genotyping of pig families without cloning and sequencing steps
Mammalian Genome 4: 243-246
- Mirol PM, Mascheretti S und Searle JB (2000)**
Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial cytochrome b in ctenomys (caviomorpha, rodentia) with either great similarity to or high divergence from the true mitochondrial sequence
Heredity 84: 538-547
- Moyret C, Theillet C, Puig PL, Molés, J-P, Thomas G und Hamelin R (1994)**
Relative efficiency of denaturing gradient gel electrophoresis and single strand conformation polymorphism in the detection of mutations in exons 5 to 8 of the p53 gene
Oncogene 9: 1739-1743
- Mülhardt C (1999)**
Der Experimentator: Molekularbiologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / Jena / Lübeck / Ulm
- Müller M, Kruse L, Tabrett AM und Barbara DJ (1997)**
Detection of a single base exchange in PCR-amplified DNA fragments using agarose gel electrophoresis containing bisbenzimidide-PEG
Nucleic Acids Research 25: 5125-5126
-

-
- Nakajima E, Matsumoto T, Yamada R, Kawakami K, Takeda K, Ohnishi A und Komatsu M (1996)**
Use of a PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) for detection of a point mutation in the swine ryanodine receptor (RYR1) gene
Journal of Animal Science 74: 2904-2906
- Nakamichi N, Rhoads DD, Hayashi J-I, Kagawa Y und Matsumura T (1998)**
Detection, Localization, and Sequence Analyses of Mitochondrial Regulatory Region RNAs in Several Mammalian Species
J. Biochem. 123: 392-398
- Newton CR und Graham A (1994)**
PCR, 2. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg / Berlin / Oxford
- Newton JM, Wilkie AL, He L, Jordan SA, Metallinos DL, Holmes NG, Jackson IJ und Barsh GS (2000)**
Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog
Mammalian Genome 11: 24-30
- Nielsen VH, Larsen NJ und Thomsen B (1998)**
RFLPs at the porcine growth hormone receptor (GHR) gene: evidence of an insertion/deletion
Animal Genetics 29: 400-401
- Nijman I (1999)**
Repetitive DNA elements as genetic and phylogenetic markers in the genomes of cattle and other ruminants
Dissertation Universität Utrecht / NL
- Oishi T, Amano T und Tanaka K (1993)**
Phylogenetic relationship among seventeen pig breeds analyzed by principal component analysis based on blood groups and polymorphisms
Journal of Animal Genetics 21: 29-31
- Ojala D, Montoya J und Attardi G (1981)**
tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria
Nature 290: 470-474
- Okumura N, Ishiguro N, Nakano M, Hirai K, Matsui A und Sahara M (1996)**
Geographic Population Structure and Sequence Divergence in the Mitochondrial DNA Control Region of the Japanese Wild Boar (*Sus scrofa leucomystax*), with Reference to Those of Domestic Pig
Biochemical Genetics 34: 179-189
- Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanobe T, Ishiguro N, Yasue H und Mitsuhashi T (2001)**
Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs
Animal Genetics 32: 139-147
- Otsu K, Phillips MS, Khanna VK, De Leon S und MacLennan DH (1992)**
Refinement of diagnostic assays for a probable casual mutation for Porcine and human malignant hyperthermia
Genomics 13: 835-837
- Pauli U, Liniger M, Zimmermann A und Schrott M (2000)**
Extraction and amplification of DNA from 55 foodstuffs
Mitt. Lebensm. Hyg. 91: 491-501
-

PE Applied Biosystems (1997)

ABI Prism™ 310 User's Manual

Pérez T, Albornoz J und Domínguez A (1998)An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature
Molecular Ecology 7: 1347-1357**Pielberg G, Olsson C, Syvänen A-C und Andersson L (2002)**Unexpectedly High Allelic Diversity at the KIT Locus Causing Dominant White Color in the Domestic Pig
Genetics 160: 305-311**Plath A, Krause I und Einspanier R (1997)**Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 205: 437-441**Promega Corporation, Madison, WI, USA (1998)**

Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Technical Manual

QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Straße 4, 40724 Hilden (1998)

QIAquick PCR Purification Kit Handbook

QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Straße 4, 40724 Hilden (1999)

QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook

Ram JL, Ram ML und Baidoun FF (1996)Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA
J. Agric. Food Chem. 44: 2460-2467**Rea S, Chikuni K und Avellini P (1996)**Possibility of using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for discriminating European pig wild boar meat samples
Italian Journal of Food Science 3: 211-220**Rehbein H, Mackie IM, Gonzales-Sotelo C, Perez-Martin R, Quintero J und Rey-Mendez M (1995)**Fish species identification in Canned Tuna by DNA Analysis (PCR-SSCP)
Inf. Fischwirtschaft 42: 209-212**Remane A, Storch V und Welsch U (1985)**Kurzes Lehrbuch der Zoologie, 5. Auflage
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / New York**Rikke BA, Garvin LD und Hardies C (1991)**Systematic identification of LINE-1 repetitive DNA sequence differences having species specificity between *mus spretus* and *mus domesticus*
Journal of Molecular Biology 219: 635-643**Roche Molecular Biochemicals (1998)**

LightCycler™-DNA Master Hybridization Probes-Beipackzettel, Version 1

Roche Molecular Biochemicals (1999)

LightCycler™ Operator's Manual Version 3.0

Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K und Rasmussen OF (1992)Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions
International Journal of Food Microbiology 17: 37-45

-
- Rüggeberg H, Garde W, Tschirdewahn B, Booke A und Müller M (1997)**
Tierartidentifizierung bei gekochten Fleischproben. Ein methodischer Vergleich der PCR-Analyse, der DNA-Sonden-Technik und der isoelektrischen Fokussierung
Fleischwirtschaft 77: 732-734
- Russell VJ, Hold GL, Pryde SE, Rehbein H, Quinteiro J, Rey-mendez M, Sotelo CG, Pérez-Martin RI, Santos AT und Rosa C (2000)**
Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between Salmon species
Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 2184-2188
- Russo V, Davoli R, Nicoli D und Zambonelli P (1995)**
Bg1II and HincII detect polymorphisms at porcine GPI locus
Animal Genetics 26: 207
- Saccone C, Pesole G und Sbisà E (1991)**
The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern
Journal of Molecular Evolution 33: 83-91
- Sakai C, Kawakami Y, Law LW, Furumura M und Hearing Jr VJ (1997)**
Melanosomal proteins as melanoma-specific immune targets
Melanoma Research 7: 83-95
- Samraus HH (1994)**
Gefährdete Nutztierassen. Ihre Zuchtgeschichte, Nutzung und Bewahrung
Ulmer Verlag, Stuttgart
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989)**
Molecular Cloning, 2.Auflage
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S und Coulson A R (1977)**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5463-5467
- Sankoff D, Leduc G, Antoine N, Paquin B, Lang BF und Cedergren R (1992)**
Gene order comparisons for phylogenetic inference: Evolution of the mitochondrial genome
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6575-6579
- Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn K, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L und Lenstra J (1999)**
Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art
Journal of Clinical Microbiology 37: 3083-3091
- Schapira AHV und Cock HR (1999)**
Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies
European Journal of Clinical Investigation 29: 886-898
- Schmidt ER, Hankeln T und Feldmann R (1997)**
Bestimmung der Spezies durch Analyse der Satelliten DNA aus Zellkulturzellen oder Gewebeproben (Satelliten-DNA-Spezies-Diagnostik=SDSD)
Skript
- Schmoelzl S, Leeb T, Brinkmeier H, Brem G und Brenig B (1996)**
Regulation of tissue-specific expression of the skeletal muscle ryanodine receptor gene
J. Biol. Chem. 271: 4763-4769
-

Schneider M, Mandorf T und Rubach K (1997)

Tierartbestimmung von Fisch durch DNA-Analyse mittels RAPD-Technik
Deutsche Lebensmittel-Rundschau 93: 137-140

Schreiber GA und Bögl KW (1997)

Neue Wege der Lebensmittelanalytik: DNA-analytische Verfahren zur
Artendifferenzierung
BgVV-Hefte, Heft 9

Schweer H (1986)

Schweinezucht im Umbruch
Tierzüchter 38: 202-204

Schwonbek (2000)

Entwicklung eines Nachweisverfahrens für gentechnisch veränderten Mais.
Diplomarbeit im BgVV, Berlin

Siebel K, Reissmann M, Wagner H-J, Wimmers K und Hardge T (2000)

Polymorphism in the tyrosinase (tyr) gene in the pig and its influence on coat color
and quantitative traits
Proc. 27. International Conference on Animal Genetics (ISAG)

Siebel K (2002)

Analyse genetischer Varianten von Loci für die Fellfarbe und ihre Beziehungen zum
Farbphänotyp und zu quantitativen Leistungsmerkmalen beim Schwein
Dissertation an der FU Berlin

Smouse PE und Chevillon C (1998)

Analytical Aspects of Population-Specific DNA Fingerprinting for Individuals
Journal of Heredity 89: 143-150

Steinborn R, Müller M und Brem G (1998)

Genetic variation in functionally important domains of the bovine mtDNA control
region
Biochimica et Biophysica Acta 1397: 295-304

Straub JA, Hertel C und Hammes WP (1999)

The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages
European Food Research and Technology 210: 62-67

**Strong SJ, Mueller MG, Litman RT, Hawke NA, Haire RN, Miracle AL, Rast JP,
Amemiya CT und Litman GW (1999)**

A novel multigene family encodes diversified variable regions
96: 15080-15085

**Suzuki I, Im S, Tada A, Scott C, Akcali C, Davis MB, Barsh G, Hearing V und Abdel-
Malek Z (1999)**

Participation of the melanocortin-1 receptor in the UV control of pigmentation
Journal of investigative dermatology. Symposium proceedings 4: 29-34

Taanman J-W (1999)

The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication
Biochimica et Biophysica Acta 1410: 103-123

**Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP und
Bouvet J (1996)**

Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR
Nucleic Acids Research 24: 3189-3194

-
- Takeda K, Onishi A, Ishida N, Kawakami K, Komatsu M und Inumaru S (1995)**
SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism
Animal Genetics 26: 321-326
- Tamate HB und Tsuchiya, T (1995)**
Mitochondrial DNA polymorphism in subspecies of the Japanese sika deer, *cervus nippon*
Journal of Heredity 86: 211-215
- Tanaka K, Kurosawa Y, Kurokawa K und Oishi T (1980)**
Genetic polymorphism of erythrocyte esterase-D in pigs
Anim. Blood Grps biochem. Genet. 11: 193-197
- Tinker NA, Fortin MG und Mather DE (1993)**
Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley
Theor Appl Genet 85: 976-984
- Tobita-Teramoto T, Jang GY, Kino K, Salter DW, Brumbaugh J und Akiyama T (2000)**
Autosomal albino chicken mutation (ca/ca) deletes hexanucleotide (-ΔGACTGG817) at a copper-binding site of the tyrosinase gene
Poultry Science 79: 46-50
- Toorop R-M, Murch SJ und Ball RO (1997)**
Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal
FOOD Research International 30: 629-636
- Trifonov EN (2000)**
Earliest pages of bioinformatics
Bioinformatics 16: 5-9
- Ursing BM und Arnason U (1998)**
The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*)
Journal of Molecular Evolution 47: 302-306
- Våge DI, Klungland H, Lu D und Cone RD (1999)**
Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep
Mammalian Genome 10: 39-43
- Van der Velten B und Schulze M (1997)**
Tierartendifferenzierung durch molekularbiologische Verfahren – Praktische Ergebnisse des SLUA Braunschweig
Lebensmittelchemie 51: 89
- Waiblinger H-U, Weber W und Kleinert T (1998)**
Differenzierung von Wildfleischproben mittels DNA- und Protein-Analytik
Lebensmittelchemie 52: 97-99
- Waiblinger HU, Pietsch K und Wurz A (1999)**
DNA-Extraktion aus Sojalecithin und Kosmetika
Lebensmittelchemie 53: 11
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J und Zoller M (1993)**
Rekombinierte DNA, 2. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg / Berlin / Oxford
-

Wen G, Leeb T, Reinhart B, Schmoelzl S und Brenig B (1996)

The porcine skeletal muscle ryanodine receptor gene structure coding region 1 to 10614 harbouring 71 exons
Anim. Genet. 27: 297-304

Wheeler DL, Chappey C, Lash AE, Leipe DD, Madden TL, Schuler GD, Tatusova TA und Rapp BA (2000)

Database resources of the National Center for Biotechnology Information
Nucleic Acids Res 28: 10-14

Wink M und Wehrle H (1994)

PCR (Polymerase Kettenreaktion) im medizinischen und biologischen Labor – Handbuch für den Praktiker
GIT-Verlag

Yim D, Jie H-B, Lanier LL und Kim YB (2000)

Molecular cloning, gene structure, and expression pattern of pig immunoreceptor DAP 12
Immunogenetics 51: 436-442

Yim,D, Jie H-B, Sotiriadis J, Kim YS, Kim KS, Rothschild MF, Lanier LL und Kim YB (2001)

Molecular cloning and characterization of pig immunoreceptor DAP10 and NKG2D
Immunogenetics 53: 243-249

Zagon J (Editor) (2000)

Development of methods to identify foods produced by means of genetic engineering
EU-Abschlussreport EUR19706EN

ZDS (1995)

Zahlen aus der deutschen Schweineproduktion 1994
Zentralverband der deutschen Schweineproduktion (ZDS), Bonn

Zehner R, Zimmermann S und Mebs D (1998)

RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application
Int. J. Legal Med. 111: 323-327

Zimmermann S, Zehner R und Mebs D (1998)

Tierartenidentifizierung aus Fleischproben mittels DNA-Analyse
Fleischwirtschaft 78: 530-533

Zipfel W und Zipfel G (1999)

Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG)
Verlag C.H.Beck

ZMP (1999)

ZMP-Bericht
ZMP

Zuckerkindl E (2002)

Why so many noncoding nucleotides? The eukaryote genome as an epigenetic machine
Genetica 115: 105-129

Zullo S, Sieu LC, Slightom JL, Hadler HI und Eisenstadt JM (1991)

Mitochondrial D-loop sequences are integrated in the rat nuclear genome
Journal of Molecular Biology 221: 1223-1235

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.-W. Bögl danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Durchführung dieser Arbeit und für die Betreuung am BgVV, die diese Arbeit erst ermöglicht hat. Herrn Prof. Dr. Dipl.-Ing. D. Knorr danke ich für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit an der Technischen Universität Berlin. Herrn Dr. Georg Meyer danke ich für seinen wissenschaftlichen Anstoß zur Bearbeitung dieses Themas.

Herrn Hermann Broll danke ich für seine Unterstützung und fachliche Betreuung sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Marianna Schauzu danke ich für die Integration in das Fachgebiet 213 am BgVV. Ihr, sowie Frau Zimmermann und Herrn Hoddow danke ich für die Bereitstellung von Geldern zur Finanzierung der Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebiets 213 am BfR, Luzia Grande, Almut Leffke, Bettina Linke, Ute Wagner, Dr. Dieter Winkler und Dr. Jutta Zagon für ihre hilfreichen Ratschläge und das angenehme Arbeitsklima. Besonders danke ich Almuth Spiegelberg, die es in diesen Jahren mit mir im gleichen Zimmer ausgehalten hat, mich stets ermutigt und in die Gepflogenheiten des Institutes eingeführt hat. Für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren möchte ich mich auch bei Ines Laube, Stefanie Noack und Dr. Mohamed Tony bedanken.

Meiner Mitstreiterin Dr. Bärbel Jansen danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft besonders in steuerlichen und versicherungstechnischen Fragen sowie den gemeinsamen Austausch über kleine und große Dinge.

Meiner Frau Amelie und meinen Söhnen Benedikt und William danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und dass sie mich so oft für diese Arbeit freigestellt haben.

Ich hebe meine Augen auf zu den Bergen. Woher kommt mir Hilfe? Meine Hilfe kommt vom

Herrn, der Himmel und Erde gemacht hat. *Psalm 121 – Danke, Jesus!*

Lebenslauf

Andreas M. O. Butschke
Paul-Schneider-Strasse 27
12247 Berlin

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtstag: 09.04.1968
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet seit dem 17.02.1995, zwei Kinder

SCHULBILDUNG

08/1974 - 07/1978 Ernst-Born-Grundschule, Bad Ems
08/1978 - 10/1978 Goethe-Gymnasium, Bad Ems
10/1978 - 06/1982 Ernst-Schlee-Gymnasium, Hamburg
08/1982 - 06/1988 Städtisches Gymnasium, Bad Segeberg (Abitur)

WEHRDIENST

07/1988 – 09/1989 Bad Segeberg

STUDIUM

10/1989 - 08/1992 Chemiestudium an der Technischen Universität Berlin; Abschluss des Grundstudiums und der organischen Chemie im Hauptstudium
08/1992 Studiengangwechsel in den Studiengang Lebensmittelchemie
10/1992 Examens-Vorprüfung für Lebensmittelchemiker
10/1992 - 10/1994 Hauptstudium der Lebensmittelchemie
11/1994 - 01/1995 Staatsexamen Teil A für Lebensmittelchemiker
09/1996 - 10/1996 Staatsexamen Teil B für Lebensmittelchemiker

PRAKTIKA

08/1995 - 02/1996 Praktikant der Lebensmittelchemie beim Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)
03/1996 - 08/1996 Praktikant der Lebensmittelchemie im Berliner Betrieb für zentrale gesundheitliche Aufgaben (BBGes)

DISSERTATION

02/1998-5/2001 Doktorarbeit an der Technischen Universität Berlin mit Durchführung der praktischen Arbeiten am BgVV

BERUF

6/2001-11/2001 Erstellung, Pflege und Auswertung einer Datenbank zur Erhebung weltweit verwendeter GVO-Nachweismethoden im Rahmen einer Codex-Alimentarius Arbeitsgruppe.

seit 12/2001 Durchführung eines EU-Projekts unter Beteiligung von 14 europäischen Partnern mit dem Ziel der Entwicklung von molekularbiologischen Methoden zur Tier- und Pflanzenartenbestimmung in Lebensmitteln (MolSpec-ID)

